

Aus der Abteilung der Neuropädiatrie in der Klinik für Pädiatrie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**N-Methyl-D-Aspartat-Antagonisten
induzieren apoptotische Zelluntergänge
im Gehirn junger Ratten**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Michael Miksa
aus Leonberg

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Ikonomidou

2. Prof. Dr. med. G.F. Hoffmann

3. Prof. Dr. med. G.B. Landwehrmeyer

Datum der Promotion: 26.03.2004

Abstract (deutsch)

Der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat spielt eine grosse Rolle in der Gehirnentwicklung, wie neuronale Migration und Synaptogenese. Ob glutamaterge Stimulation für das Überleben entwickelnder Neuronen notwendig ist, war bislang jedoch unbekannt. Um zu untersuchen, ob eine Hemmung von Glutamatrezeptoren im unreifen Gehirn zu Neurodegeneration führt, wurden Ratten im Alter von 0 bis 30 Tagen für 24 Stunden mit dem N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA) Glutamatrezeptorantagonisten Dizocilpin (MK801) behandelt. Die Dichte neuronaler Degeneration wurde mikroskopisch in Kupfer-Silber- und TUNEL- gefärbten Hirnschnittpräparaten ermittelt und Unterschiede mittels ANOVA analysiert (Signifikanzniveau $p < 0.05$). Die pharmakologische Hemmung von NMDA-Rezeptoren im unreifen Rattengehirn führte zu einer ausgedehnten Neurodegeneration, die in der frühen Neugeborenenperiode (1. bis 8. Lebenstag) am stärksten ausgeprägt war. Eine elektronenmikroskopische Untersuchung verifiziert die apoptotische Genese des Zelltodes. Während der physiologische Zelltod von Geburt an abnahm (von 0,67 auf $0,16 \times 10^5/\text{mm}^3$ am 1. und 8. Lebenstag) stieg die Apoptoserate bei MK801-behandelten Tieren der gleichen Altersgruppe von 1,95 auf $2,83 \times 10^5/\text{mm}^3$ an. Bis zum 22. Lebenstag fiel die MK801-induzierte Apoptose auf das Niveau der unbehandelten Ratten ab ($0,09$ vs. $0,05 \times 10^5/\text{mm}^3$). Betroffen waren hauptsächlich Zellpopulationen, die hohe NMDA-Rezeptordichten aufweisen und die höchste Apoptoserate wurde bei 8 Tage alten Ratten im Neokortex gefunden, wo sie bis auf das 39-fache der physiologischen Apoptose anstieg (von 1,55% auf 26% der Gesamtneuronendichte im parietalen Kortex). Während der Ontogenese scheint es somit eine vulnerable Phase zu geben, in der die NMDA-rezeptorvermittelte glutamaterge Stimulation zum Überleben unreifer Nervenzellen unabdingbar ist und selbst eine vorübergehende Blockade dieser Rezeptoren führt zu neuronaler Apoptose.

Schlagworte:

Tier/Ratten

Apoptose

Gehirn/Zytologie/pharmakologische Wirkung/Wachstum & Entwicklung

Dizocilpin-maleat (MK801)/pharmakologische Wirkung

Exzitatorische Neurotransmitter Antagonisten/pharmakologische Wirkung

Immunohistochemie/In-Situ-Nick-End Labeling (TUNEL)

Neuronale Degeneration

Neuronen/Zytologie/pharmakologische Wirkung/Metabolismus

Rezeptoren/N-methyl-D-aspartat/Antagonisten & Inhibitoren/Metabolismus

Abstract (English)

The predominant excitatory neurotransmitter glutamate plays a major role in certain aspects of neural development such as migration and synaptogenesis. However, whether developing neurons depend on glutamate for survival remains unknown. To investigate if deprivation of glutamate stimulation in the immature mammalian brain causes neuronal cell death (apoptosis), rat pups aged 0 to 30 days were treated for 24 hours with dizocilpine maleate (MK801), an N-methyl-D-aspartate-(NMDA) glutamate receptor antagonist. Density of neural degeneration was evaluated by a stereological disector method in cupric–silver and TUNEL-stained brain slices. Groups were compared by ANOVA and significance considered at $p < 0.05$. Pharmacological blockade of NMDA receptors triggered widespread neurodegeneration, with the highest occurrence in the early neonatal period (1-8 postnatal days). Ultrastructural analysis revealed the apoptotic nature of neural degeneration. Although spontaneous cell deaths decreased with age from 0.67 to $0.16 \times 10^5/\text{mm}^3$ ($p < 0.05$) they increased from 1.95 to $2.83 \times 10^5/\text{mm}^3$ ($p < 0.05$) in MK801 treated animals (0 and 7 day-old-rats respectively). At day 22, MK801-induced apoptosis reached almost normal values (0.09 vs. $0.05 \times 10^5/\text{mm}^3$). Neuronal populations most severely affected included those that have high amounts of NMDA-specific receptors and was most pronounced in the cortex of 8-day-old rats where induced apoptosis increased by up to 39-fold (1.55 to 26% of total neural population in lamina II of the parietal cortex, $p < 0.05$). It appears that during a certain stage of ontogenesis glutamatergic innervation mediated by NMDA receptors is vitally important for developing neurons and even a transient interruption triggers neuronal death.

Keywords:

Animal/Rats

Apoptosis

Brain/cytology/drug effects/growth & development

Dizocilpine Maleate (MK801)/pharmacology

Excitatory Amino Acid Antagonists/pharmacology

Immunohistochemistry/In Situ Nick-End Labeling (TUNEL)

Nerve Degeneration

Neurons/cytology/drug effects/metabolism

Receptors, N-Methyl-D-Aspartate (NMDA)/antagonists & inhibitors/metabolism

1. EINLEITUNG	3
1.1 Die Gehirnentwicklung: Brain growth spurt	3
1.2 Physiologische Apoptose	3
1.2.1 Morphologie der Apoptose	3
1.2.2 Regulation der Apoptose	5
1.2.3 Bedeutung der Apoptose	7
1.3 Der Exzitatorische Neurotransmitter Glutamat	7
1.4 Glutamatrezeptoren	7
1.4.1 Struktur der NMDA-Rezeptoren: Untereinheiten	9
1.4.2 Topologie der Untereinheiten	9
1.4.3 Heteromere Kanäle	10
1.4.4 Verteilung der NMDA-Rezeptoruntereinheiten im Gehirn	10
1.5 Aufgaben des Glutamats bzw. der NMDA-Rezeptoren	11
1.5.1 Synergistische exzitatorische Wirkung von GABA _A -, AMPA und NMDA-Rezeptoren	12
1.6 Glutamat als Neurotoxin	12
1.7 Glutamat als trophischer Faktor	14
1.8 Problemstellung	14
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 Untersuchungsmaterial	16
2.1.1 Versuchstiere	16
2.1.2 Geräte	16
2.1.3 Pharmaka und Chemikalien	16
2.2 Versuche: Vorbereitung und Versorgung	19
2.2.1 Pharmakonapplikation	20
2.2.2 Narkose und Perfusion	20

2.2.3	Präparation und Einbettung.....	21
2.2.4	Vibratomechnitt.....	21
2.2.5	Nissl-Färbung	22
2.2.6	Silberfärbung nach de Olmos	22
2.2.7	TUNEL-Färbung.....	23
2.2.8	Mikroskopische Untersuchung und Auszählung.....	24
2.2.9	Statistische Methoden.....	25
3.	ERGEBNISSE	26
3.1	Massive Neurodegeneration im Gehirn 8 Tage alter Ratten nach Behandlung mit (+)MK801.....	26
3.2	TUNEL-Färbung und Elektronenmikroskopie zum Nachweis der apoptotischen Natur der Neurodegeneration.....	29
3.3	Entwicklungsstudie: Höchste Apoptoserate im Alter von 7 Tagen nach Gabe von (+)MK801.....	31
3.4	Hemmung von AMPA- Rezeptoren: keine Erhöhung der Apoptoserate	35
4.	DISKUSSION	36
4.1	Allgemeines	36
4.2	Abhängigkeit der Apoptoseinduktion vom Entwicklungsalter	37
4.3	Bestimmende Faktoren der Apoptoseinduktion durch (+)MK801.....	37
4.3.1	Spezifität der NMDA-Antagonisten	37
4.3.2	Proapoptotische Wirkung von GABA _A -Agonisten.....	38
4.3.3	Pharmakologische Eigenschaften von (+)MK801.....	38
4.3.4	Verteilungsmuster der Apoptose und der NMDA-Rezeptorsubtypen.....	38
4.4	Neurotoxizität von NMDA-Antagonisten bei erwachsenen Tieren	39
4.5	Mechanismen der Apoptoseinduktion.....	40
4.5.1	Intrazellulärer Kalziumspiegel	40

4.5.2	Molekulare Mechanismen der Apoptoseinduktion.....	41
4.5.3	Neuronale Wachstumsfaktoren	43
4.6	Bedeutung der Ergebnisse im klinischen Zusammenhang.....	43
4.6.1	NMDA-Antagonisten in der pädiatrischen Anästhesie	44
4.6.2	Drogenmissbrauch werdender Mütter	44
4.6.3	Neurodegenerative Erkrankungen und NMDA-Rezeptoren.....	45
4.7	Schluss.....	46
5.	ZUSAMMENFASSUNG	47
6.	GLOSSAR	48
7.	LEBENS LAUF UND PUBLIKATION	50
8.	LITERATURVERZEICHNIS	52
9.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	69
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	72

1. Einleitung

1.1 Die Gehirnentwicklung: Brain growth spurt

Das Gehirn eines Säugetieres durchläuft in seiner Entwicklung eine Phase schnellen Wachstums, die auch als *brain growth spurt* bezeichnet wird. Die relative Endgröße bezogen auf das Gesamtgewicht und auch der Zeitpunkt der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit ist von Tier zu Tier unterschiedlich. So kann der maximale Wachstumsschub bereits pränatal, wie beim Affen, oder auch *post partum* stattfinden, z.B. bei der Ratte. Beim Menschen beginnt dieser Wachstumsspurt im 6.

Schwangerschaftsmonat, hat eine maximale Geschwindigkeit zum Geburtstermin und endet zu Beginn des dritten Lebensjahres. Bei der Ratte liegt die Phase der maximalen Geschwindigkeit zwischen dem 6. und 10. Lebenstag und endet nach der dritten Lebenswoche, kommt somit der Entwicklung des menschlichen Gehirns sehr nahe (1). In dieser Phase der Hirnentwicklung vermehrt sich die Hirnmasse nicht nur durch Zellteilung von Neuroblasten, sondern es finden gleichzeitig verschiedene Vorgänge statt, wie die Migration der späteren Nervenzellen an ihren Bestimmungsort, Differenzierung dieser Zellen und die Synaptogenese. Das macht diese Phase zu einem besonders vulnerablen Zeitpunkt gegenüber äußeren Einflüssen. Das Gehirn produziert in dieser Zeit einen „Überschuss“ an Neuronen, dem durch einen geregelten Zelluntergang bestimmter Neuronen entgegengewirkt wird. So kommt physiologischer (programmierter) Zelltod natürlicherweise im sich entwickelnden Gehirn vor, wodurch ca. 50% der ursprünglich produzierten Neuronen beseitigt werden (2, 3, 4).

1.2 Physiologische Apoptose

1.2.1 Morphologie der Apoptose

Schon 1842 wurde von Carl Vogt ein programmierter Zelltod postuliert. Kerr, Wyllie und Currie prägten hierfür 1972 den Begriff Apoptose (5). Es handelt sich hierbei um einen Zelltod, der sich morphologisch und biochemisch wesentlich von der Nekrose unterscheidet, die u.a. nach Hypoxie oder Ischämie auftritt. Bei der Nekrose oder akuten Zelldegeneration neigen die Zellen zur Schwellung (Onkose) und Lyse, das Plasmalemm wird zerstört und der Zytosolinhalt und die Organellen werden freigesetzt, was eine Entzündungsreaktion hervorruft. Bei der Apoptose kommt es dagegen zu

Zellschrumpfung, Kondensation des Chromatins und Aggregation des Chromatins an der Zellkernperipherie. Die DNA wird hierbei durch Endonukleasen zwischen den Nukleosomen in Fragmente von ca. 200 Basenpaaren oder ganzzahlige Vielfache davon gespalten. Die Zellmembranstabilität nimmt ab und es kommt zu Ausstülpungen der Zelle (Zeiose). Schließlich schnüren sich membranumschlossene Säckchen (=apoptotische Körperchen, der Vorgang wird auch *blebbing* genannt) ab, die von Makrophagen phagozytiert werden. Dies dauert oft nur wenige Stunden und es kommt dabei im Gegensatz zur Nekrose zu keiner Entzündungsreaktion (6).

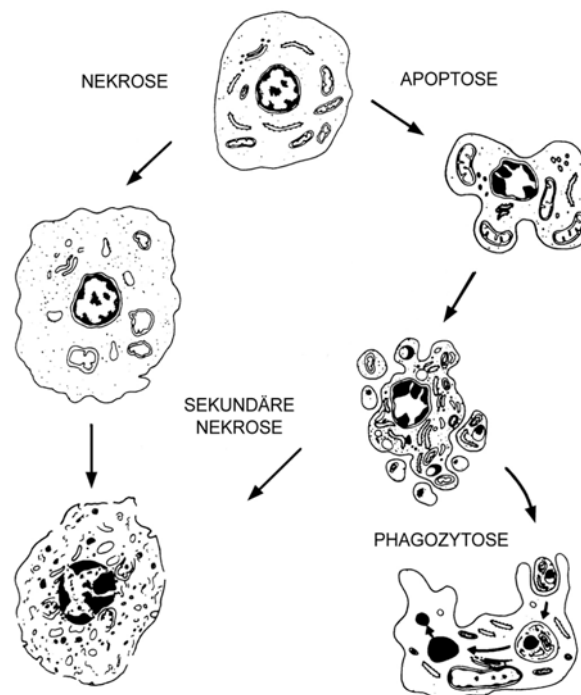


Abbildung 1 Morphologische Gegenüberstellung von Nekrose und Apoptose. Während der Nekrose schwellen die Zellen zunächst an und die Zellorganellen werden freigesetzt, was eine Entzündungsreaktion hervorruft (links im Bild). Bei der Apoptose kommt es zur Chromatinkondensation an der Zellkernperipherie und zum Abschnüren apoptotischer Körperchen, die von Makrophagen phagozytiert werden. Graphik adaptiert nach Blom (7).

Kerr et al. (8) beschrieben zwar hauptsächlich morphologische Charakteristika der Apoptose in Leber, Milz und anderen nichtneuronalen Geweben, aber auch ein Beispiel neuronaler Apoptose – nämlich den physiologischen Zelltod (PCD = *physiological cell death*), der während der normalen Hirnentwicklung zu finden ist (2, 8). Die Unterschiede zwischen exzitotoxischem neuronalen Zelltod, dem physiologischen Zelltod von Neuronen und der neuronalen Apoptose als pathologischem Zelltod nach zerebralen Insulten wurden später von Ishimaru et al. (3) beschrieben. Mittels

Elektronenmikroskopie untersuchte er Gehirnzellen von jungen Ratten und zeigte, dass nach Ischämie oder Trauma hauptsächlich die oben beschriebenen Zeichen nekrotischen Zelltods zu finden sind und dass sich dieser Zustand morphologisch fundamental vom physiologischen neuronalen Zelltod (Apoptose) unterscheidet.

1.2.2 Regulation der Apoptose

Die Apoptose wird durch verschiedene Gene gesteuert. Diese wirken entweder proapoptotisch – also Apoptose induzierend – oder antiapoptotisch und halten sich normalerweise die Waage. Um das Zusammenspiel dieser Gene besser zu verstehen, wurde insbesondere der Wurm *Caenorhabditis elegans* intensiv untersucht. Bei ihm sterben 131 von anfänglich insgesamt 1090 somatischen Zellen während der Entwicklung durch programmierten Zelltod. Dieser Vorgang wird entscheidend durch die proapoptotischen Gene *ced-3* und *ced-4* und das antiapoptotische Gen *ced-9* gesteuert. Beim Menschen wurden ebenfalls entsprechende Gene gefunden, wie z.B. das antiapoptotische Gen *bcl-2* oder das proapoptotische *bax*-Gen (9).

Zur Auslösung der Apoptose benötigt die Zelle in der Regel ein Signal. Dieses kann ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, DNA-Schädigung oder ein Mangel an Wachstumsfaktoren sein (intrinsische Aktivierung). Aber auch eine extrinsische Aktivierung über spezifische Rezeptoren führt zum Zellsuizid. An Lymphozyten wurde beispielsweise der Oberflächenrezeptor CD95 (auch APO-1 oder Fas genannt) gefunden. Dieser gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren (Tumor Nekrose Faktor) und löst, nachdem seine Liganden (hier der Fas-Ligand: Fas-L) an ihn gebunden haben, eine proteolytische Kaskade aus. Hierbei werden so genannte Caspasen aktiviert (Cystein-[haltige] Aspartasen; sie spalten Proteine nach einem Aspartat), die zelluläre Substrate (u.a. das Zellgerüst) spalten. Dadurch werden auch endonukleasehemmende Proteine inaktiviert und es kommt über DNA-Fragmentierung zum Bild der Apoptose. Über einen alternativen Weg werden Mitochondrien aktiviert. Der *permeability transition pore* (PTP), ein mitochondrialer Proteinkomplex, hält normalerweise ein Potential an der inneren Mitochondrienmembran aufrecht. Die Öffnung dieses Kanals führt zur Depolarisierung und damit zur Freisetzung mitochondrialer Apoptosefaktoren (wie Cytochrom c, APAF-1 und AIF) (10, 11, 12). Das normalerweise membrangebundene Cytochrom c bildet mit APAF-1 (Apoptose-Proteasen induzierender Faktor, er entspricht dem *ced-4*-Genprodukt von *Caenorhabditis elegans*) und ATP, einen Apoptosom-

Komplex, aktiviert die Caspase-9 und löst dadurch die proteolytische Kaskade aus. Außerdem wird ein *apoptosis inducing factor* (AIF) freigesetzt, der caspaseunabhängig zu DNA-Fragmentierung, Chromatinkondensation und oben geschildertem *blebbing* führt. Die Apoptosefaktoren der Bcl-2 Familie können den programmierten Zelltod auf mitochondrialer Ebene beeinflussen indem sie Freisetzung weiterer Apoptosefaktoren modulieren (13).

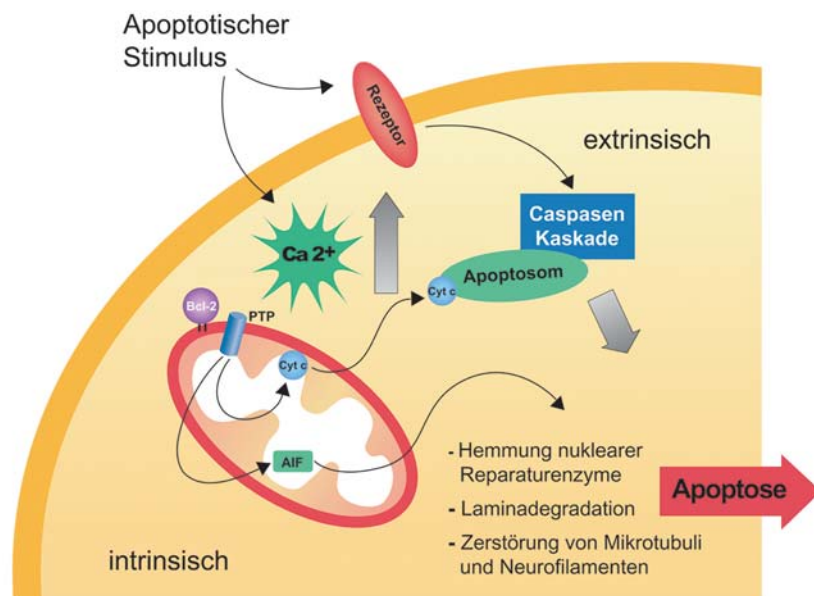


Abbildung 2. Schema der apoptotischen Kaskade. Extrinsische Faktoren aktivieren über die Bindung an Oberflächenrezeptoren apoptoseinduzierende Caspasen, während intrinsische Faktoren über intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung zur Aktivierung von Caspasen führen. Alternativ wird das mitochondriale Cytochrom c (Cyt c) freigesetzt, welches mit APAF1 und ATP einen Apoptosom-Komplex bildet. Dieses löst über die Aktivierung der Caspase 9 die proteolytische Kaskade aus. Unabhängig von der Kaskade kann der Apoptose induzierende Faktor (AIF) zur DNA-Fragmentierung führen. Bcl-2 moduliert auf mitochondrialer Ebene die Apoptosenkaskade. Der *permeability transition pore* (PTP), ein mitochondrialer Proteinkomplex, hält normalerweise ein Potential an der inneren Mitochondrienmembran aufrecht. Die Öffnung dieses Kanals führt zur Depolarisierung und damit zur Freisetzung mitochondrialer Apoptosefaktoren (z.B. Cyt c, APAF-1 [nicht dargestellt] und AIF). Adaptiert nach Toescu (14).

Die Kontrolle der Apoptose erfolgt durch verschiedene extrazelluläre Signale. So überleben z.B. Neuronen während der Entwicklungsphase nur dann, wenn sie ausreichend Wachstumsfaktoren, wie z.B. den Nervenwachstumsfaktor NGF (*nerve growth factor*) erhalten, die von den innervierten Zielzellen sezerniert werden. Nur Neuronen, die suffizient arbeiten, erhalten somit ausreichend trophische Signale, um zu überleben. Aber auch die Zielzellen sterben ohne afferente Stimulation. Es besteht somit während der Synaptogenese eine Interaktion zwischen Neuronen und ihren Zielzellen, die das Überleben beider Zellen beeinflusst (5).

1.2.3 Bedeutung der Apoptose

Die Apoptose übernimmt während der Entwicklung regulative Aufgaben. So dient sie neben der Kontrolle der Zellzahl (Neuronen s. o.) und der Formung von Strukturen (z.B. Finger) der Entfernung unnötiger Strukturen (z.B. Müller'sche Gänge beim Mann). Sie hat aber auch später Einfluss auf den Erhalt des Körpersystems und sorgt für die Eliminierung abnormer, infizierter oder schädigender Zellen (z.B. Tumorzellen) (15). Sowohl Überschuss als auch ein Mangel an Apoptose kann pathologisch sein. Beispielhaft für eine geringe Apoptoseaktivität ist die Myelomeningozele oder das Neuroblastom, während bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. bei der Alzheimer Demenz oder den neuronalen Ceroidlipofuszinosen (M. Batten), eine überschießende Apoptoseaktivität diskutiert wird (16, 17, 18).

1.3 Der Exzitatorische Neurotransmitter Glutamat

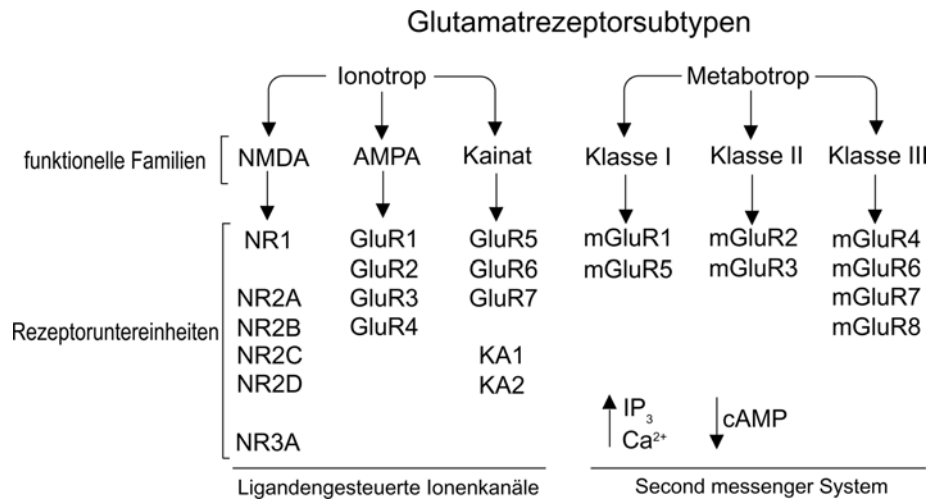
Im Gehirn von Säugetieren gibt es exzitatorische und inhibitorische Systeme. Die Aminosäure Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (19). Ca. 40% der präsynaptischen Nervenendigungen setzen Glutamat und Aspartat (eine weitere exzitatorische Aminosäure) frei. Diese Aminosäuren vermitteln über Rezeptoren unter anderem kognitive, mnestiche, motorische und sensible Funktionen und beeinflussen die Plastizität neuronaler Synapsen.

1.4 Glutamatrezeptoren

Die Signalübertragung des glutamatergen Systems verläuft über ionotrope Rezeptoren, welche direkt Ionenkanäle steuern, und metabotrope Rezeptoren, die über *second-messenger* agieren und Kalzium aus intrazellulären Kompartimenten freisetzen. Es sind derzeit acht metabotrope Glutamatrezeptoren bekannt, die in drei Klassen – mGluRI, mGluRII und mGluRIII (mGluR1-8)– eingeteilt werden (20).

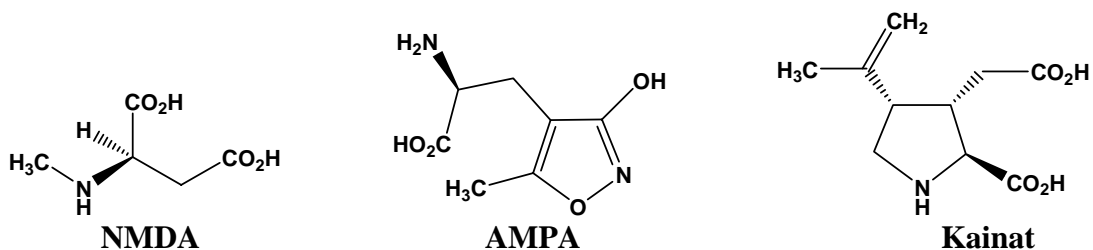
Die ionotropen Rezeptoren können aufgrund ihrer bevorzugten Agonisten in drei Untergruppen eingeteilt werden. Diese sind die N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA) Rezeptoren, die α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionsäure-Rezeptoren (AMPA: Rezeptoren GluR1-4) und die Kainat-Rezeptoren (GluR5-7 & KA1, KA2; AMPA und Kainat-Rezeptoren werden auch als non-NMDA-Rezeptoren zusammengefasst).

Tabelle 1: Glutamaterezeptorsubtypen NMDA-, AMPA-, Kainat- und metabotrope Rezeptoren mit ihren Untereinheiten. Die ionotropen Rezeptoren steuern direkt Ionenkanäle, während metabotrope Rezeptoren über second messenger wirken und sekundär zu intrazellulärem Ca^{2+} -Anstieg führen können. Modifiziert nach Dingledine (21).



Der NMDA-Rezeptorkanal ist der am besten beschriebene Subtyp mit hochselektiven Liganden wie dem Agonisten NMDA und dem Antagonisten D-2-Amino-5-Phosphonovalerat (APV). Johnson und Asher fanden heraus, dass unter physiologischen Bedingungen zur Aktivierung des NMDA-Rezeptorkanals neben der Bindung von L-Glutamat auch die Anwesenheit von Glycin benötigt wird (22).

Dieser Rezeptor unterscheidet sich wesentlich von den non-NMDA-Rezeptorkanälen, denn er ist sowohl spannungs- als auch ligandenabhängig. Außerdem ist das exzitatorische postsynaptische Potential (EPSP), das hier ausgelöst wird, im Vergleich zu denen von non-NMDA-Rezeptoren verlängert (23). NMDA-Rezeptorkanäle besitzen eine hohe Permeabilität für Ca^{2+} -Ionen, und die Spannungsabhängigkeit dieser Rezeptoren kann durch eine Mg^{2+} -Ionen-Blockade innerhalb des Kanals beeinflusst werden (23).



Strukturformeln 1 Strukturformeln der drei spezifischen Agonisten ionotroper Glutamaterezeptoren.

1.4.1 Struktur der NMDA-Rezeptoren: Untereinheiten

Der NMDA-Rezeptorkanal besteht aus 5 Untereinheiten, welche in zwei Familien eingeteilt werden. Bei der Ratte sind dies die Untereinheiten NR1 und NR2. Bei der Maus werden sie GluR ζ 1 (entsprechend NR1) und GluR ϵ (NR2) genannt. Es gibt 4 Untereinheiten der NR2 bzw. der GluR ϵ -Gruppe. Von den NR1- bzw. GluR ζ 1-Untereinheiten ist bislang nur ein Mitglied bekannt. Kürzlich wurde noch eine Untereinheit einer dritten Gruppe entdeckt (NR3A), die wahrscheinlich eine regulative Aufgabe übernimmt (24, 25).

1.4.2 Topologie der Untereinheiten

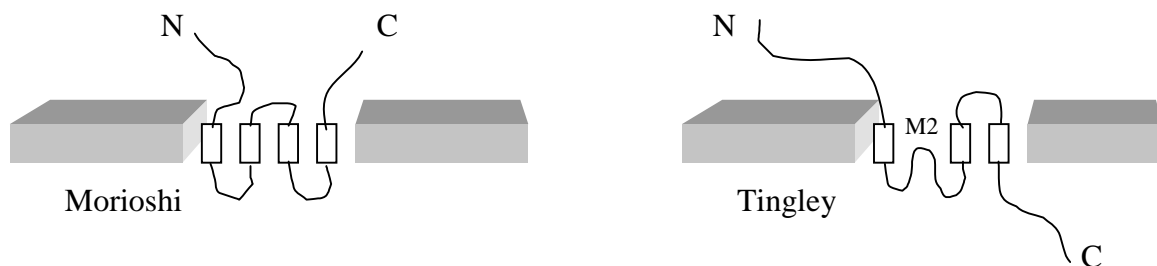


Abbildung 3. Zwei Modellvorstellungen zur Transmembrantopologie der NMDA-Rezeptoruntereinheit. Das Signalpeptid liegt extrazellulär am N-terminalen Ende. Bei Tingleys Modell wird davon ausgegangen, dass das C-terminale Ende intrazellulär liegt, wobei das Segment M2 nur eine Schleife in die Zellmembran bildet (23).

Die NMDA-Rezeptorkanaluntereinheiten haben ein N-terminales Signalpeptid und vier hydrophobe Transmembransegmente M1-M4, wovon M2 die Kanalregion bildet. Die Ca^{2+} -Durchlässigkeit wird durch ein Asparagin determiniert, das im Segment M2 lokalisiert ist. Wird dieses Asparagin z.B. durch Glutamin ersetzt, so ist die spannungsabhängige Hemmung des Kanals mittels Mg^{2+} -Ionen stark reduziert und das Kalzium kann frei passieren (26). Dies passt gut zur Vorstellung, dass Magnesium tief innerhalb des Rezeptorkanals als Inhibitor agiert. Diese Mg^{2+} -Blockade ist abhängig vom Entwicklungsalter und bei erwachsenen Ratten stärker ausgeprägt als bei Jungtieren. Nichtkompetitive Antagonisten wie PCP, (+)MK801 (Dizocilpin) und Ketamin überbrücken die Bindungsstelle für Magnesium in der M2-Region und wirken so inhibitorisch. Das C-terminale Ende des Rezeptorproteins scheint Aufgaben in der Signaltransduktion zu übernehmen und muss folglich intrazellulär liegen. Daher wird

von Tingleys Membrantopologiemodell ausgegangen in dem das M2 Segment der Rezeptoruntereinheit eine Schleife in der Zellmembran bildet (Abbildung 3, (27)).

1.4.3 Heteromere Kanäle

NMDA-Rezeptoren haben vermutlich eine heteromere Tertiärstruktur, da sie nur dann voll funktionstüchtig sind, wie in einer Studie von Morioshi *et al.* gezeigt wurde. Er exprimiert die NMDA-Rezeptoruntereinheiten in *Xenopus-Oozyten* (Ovarialzellen eines Frosches). Die reine Expression von NR1/ ζ 1-Untereinheiten führt zur Ausbildung homomerer Kanäle, die auf einen Stimulus mit L-Glutamat + Glycin oder NMDA + Glycin eine sehr kleine Reizantwort geben (28). Hochaktive NMDA-Rezeptoren entstehen erst, wenn die NR1/ ζ 1-Untereinheit zusammen mit einem der vier NR2/ ϵ -Untereinheiten exprimiert wird. Die Reizantworten des NR2/ ϵ -NR1/ ζ 1-Kanals können, wie bei natürlich vorkommenden Rezeptoren, durch NMDA-Rezeptorantagonisten wie APV, 7CK (7-Chloroquinurenat), Mg^{2+} , Zn^{2+} und (+)MK801 unterdrückt werden (29).

1.4.4 Verteilung der NMDA-Rezeptoruntereinheiten im Gehirn

Das Verteilungsmuster der NMDA-Rezeptoruntereinheiten verändert sich wesentlich während der Entwicklung des Gehirns. Durch In-Situ-Hybridisierung bei Mäusen und Ratten konnte gezeigt werden, dass zwar die NR1/ ζ 1-Untereinheit-mRNA ab dem 17. Embryonaltag ubiquitär im Hirn exprimiert wird (30), die Expression der NR2/ ϵ -Untereinheiten ist aber in den verschiedenen Lebensabschnitten unterschiedlich. Im erwachsenen Gehirn ist die Rezeptoruntereinheit NR2A/ ϵ 1 vermehrt im cerebralen Cortex, der Hippocampusformation und in den cerebellären Granulazellen zu finden. NR2B/ ϵ 2 wird selektiv im Vorderhirn exprimiert (vereinzelt im cerebralen Kortex, Hippocampus, Septum, Putamen-Caudatus-Komplex, im *Bulbus olfactorius* und im Thalamus). NR2C/ ϵ 3 wird vor allem im Cerebellum gefunden, besonders in der Granulazellschicht. NR2D/ ϵ 4 wird nur in sehr geringen Mengen im Hirnstamm und im *Bulbus olfactorius* gefunden.

Bei Jungtieren zeigt sich ein ganz anderes Bild. Im embryonalen Hirn werden nur NR2B/ ϵ 2 und NR2D/ ϵ 4 exprimiert, hierbei wird NR2B/ ϵ 2 ubiquitär gefunden, während NR2D/ ϵ 4 ausschließlich im Diencephalon und im Hirnstamm exprimiert wird. Innerhalb der ersten zwei Wochen nach der Geburt verändern sich die Expressionsmuster von

NR2/ ϵ -Untereinheiten drastisch. Die NR2A/ ϵ 1-Untereinheit erscheint im gesamten Gehirn und NR2C/ ϵ 3 im Zerebellum. Dagegen wird die Expression von NR2B/ ϵ 2 auf das Vorderhirn beschränkt, und die Expression von ϵ 4 wird insgesamt stark vermindert (30).

1.5 Aufgaben des Glutamats bzw. der NMDA-Rezeptoren

NMDA-Rezeptoren spielen bei der Migration von Neuronen und bei der synaptischen Plastizität während der Entwicklung eine große Rolle und zerebelläre Körnerzellen wurden hierzu am intensivsten untersucht (31). Der primäre Neurotransmitter dieser Neuronen ist Glutamat und auf ihren Dendriten und Perikaria werden NMDA- und non-NMDA-Rezeptoren exprimiert (32, 33). Die Reifung dieser Zellen findet bei Ratten in der postnatalen Periode statt und zeigt typische Muster der Differenzierung und Migration, die einem geregelten Plan folgen und durch sequentielle Expression bestimmter Gene in spezifischen Stadien der Entwicklung reguliert werden (34, 35). Dabei werden die Körnerzellen in der äußeren germinativen Schicht generiert, wo sie sich differenzieren. Sie legen ihre Somata dicht an die Bergmannschen Gliafasern und wandern innerhalb von drei Tagen durch amöboide Bewegung in die innere Körnerschicht, wo sie von den Moosfasern innerviert werden (36, 37, 38). Dieser Prozess ist abhängig von einem Ca^{2+} -Einstrom, der durch Glutamat an NMDA-Rezeptoren vermittelt wird (39, 40).

In verschiedenen Versuchen wurden Rezeptorantagonisten appliziert und die zurückgelegte Strecke des Pseudopodiums gemessen. So wird durch eine Blockade der NMDA-Rezeptoren durch spezifische Antagonisten, wie z.B. (+)MK801 und D-AP5 (D-2-Amino-5-phosphono-pentanoat), dosisabhängig die Zellmigration stark gehemmt. Andererseits lässt sich die Migrationsrate ebenso steigern, indem man die NMDA-Rezeptoraktivität durch Entfernung des Magnesiums aus dem Rezeptorkanal oder Hinzufügen von Glycin zur Zellkultur erhöht (41).

Es wurde auch untersucht, welche Rolle andere ionotrope Rezeptoren bei der Migration unreifer Neuronen spielen, wie z.B. non-NMDA- und GABA-erge Rezeptoren. Sie werden von unreifen Granulazellen exprimiert und beeinflussen indirekt den Ca^{2+} -Einstrom sowie die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Aber eine Blockade der non-NMDA-Rezeptoren durch NBQX oder der GABA-Rezeptoren durch Bicuculline (GABA_A -Inhibitor) und Baclofen (GABA_B -Inhibitor) führt zu keiner Veränderung der Migrationsrate (42, 43).

1.5.1 Synergistische exzitatorische Wirkung von GABA_A-, AMPA und NMDA-Rezeptoren

Auch wenn non-NMDA- und GABA-Rezeptoren keinen Einfluss auf die Migrationsrate haben, spielen sie während der Entwicklung des Säugerhirns eine wichtige Rolle. γ -Aminobuttersäure (GABA) ist als wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter des zentralen Nervensystems bekannt. Aber im unreifen Rattengehirn zeigt sie exzitatorische Funktionen. Während der ersten postnatalen Woche führt die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren zur Depolarisation von Hippocampusneuronen mit konsekutivem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (44). Diese Depolarisation ist notwendig, um den Mg^{2+} -Ionen-Block des NMDA-Rezeptorkanals zu lösen, damit dieser exzitatorisch aktiv werden kann. In der zweiten postnatalen Woche führt die Aktivierung der GABA_A-Rezeptoren zur Hyperpolarisierung der neuronalen Membran, was zur Reduktion intrazellulären Kalziums und zur verminderten Erregbarkeit der Neuronen führt. GABA wirkt dann also inhibitorisch (45). Gleichzeitig übernimmt der AMPA-Rezeptor schrittweise die Aufgabe, neuronale Membranen zu depolarisieren und somit den NMDA-Rezeptorkanal zu öffnen. Erst diese synergistische Interaktion von NMDA-, AMPA- und GABA_A-Rezeptoren ermöglicht die Signaltransmission in frühen Entwicklungsstadien.

Auf neurophysiologischer Ebene lässt sich zeigen, dass es während der Hirnentwicklung zu Veränderungen in den oszillatorischen Schwankungen intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen kommt. Da Kalziumionen entweder über den NMDA-Rezeptorkanal oder über spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle in die Zelle strömen, entstehen zwei Arten von Ca^{2+} -Oszillationen: schnell an- und abflutende Spitzen (so genannte *spikes*) und langsamere Wellen (*waves*) (46). Synaptisch vermittelte Depolarisationen korrelieren mit Ca^{2+} -Spitzen. Diese resultieren aus dem Einstrom von Ca^{2+} über rezeptor- und spannungsabhängige Kanäle und dem gleichzeitigen Freisetzen intrazellulären Kalziums. Diese *spikes* verschwinden, sobald das Hirn gereift ist. Von da an persistieren die Ca^{2+} -Wellen (47).

1.6 Glutamat als Neurotoxin

Trotz seiner wichtigen Rolle während der Entwicklung (Migration, Synaptogenese) kann Glutamat auch schädigend auf die Nervenzellen wirken. Erstmals wurde dieses Phänomen der Neurotoxizität beobachtet, als jungen Mäusen systemisch Glutamat

appliziert wurde, was zu einer retinalen Degeneration führte (48). Später wurde hierfür von Olney der Begriff der Exzitotoxizität geprägt (49). Olney beschrieb die licht- und elektronenmikroskopisch sichtbaren Veränderungen, die die Neuronen hierbei durchlaufen. Es handelt sich hierbei um einen akuten Zelltod, bei dem die Neurone anschwellen und es zur Kernpyknose kommt. Elektronenmikroskopisch sind erste Veränderungen an den Dendriten sichtbar, die erheblich dilatieren, während die Axone unverändert bleiben. Im Perikaryon vakuolisiert das endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien schwellen ödematös an. Das Chromatin des Zellkerns verklumpt erst, nachdem die zytoplasmatischen Organellen bereits verändert sind. Schließlich werden die Reste phagozytiert (3, 49). Diese Exzitotoxizität lässt sich durch verschiedene Stimuli wie Hypoxie oder Trauma auslösen und entsteht vermutlich teilweise durch die Freisetzung intrazellulären Glutamats aus degenerierenden Neuronen. Diese enthalten nämlich die 2.000- bis 5.000-fache Konzentration an Glutamat, verglichen mit der Glutamatkonzentration im Interstitium (10 mM vs. 2-5 μ M) (50).

In einer Studie von Ikonomidou et al. (51) wurde die Sensitivität des sich entwickelnden Rattengehirns gegenüber Hypoxie und Ischämie und gegenüber der neurotoxischen Wirkung von NMDA in unterschiedlichen postpartalen Altersstufen verglichen. Die Ischämie bestand in einseitiger Ligatur der *Arteria carotis communis* und die Hypoxie durch Aussetzen der Ratten in einem partiellen Vakuum. Es zeigte sich, dass hierbei die Vulnerabilität des unreifen Gehirns besonders in der frühen Neonatalzeit erhöht ist (postpartaler Tag 2-4). Sie erreicht einen Höhepunkt am 6. Lebenstag und fällt dann mit zunehmendem Alter wieder ab. Im zweiten Teil der Studie wurde NMDA unilateral in den Kopf des *Nucleus caudatus* der Ratten in verschiedenen postnatalen Altersstufen (Lebenstag 2-80) mikroinjiziert. In der frühen Neonatalperiode (Tag 2-6) führen relativ geringe Dosen von NMDA (6-15 nmol) zu einer dosisabhängigen weitreichenden exzitotoxischen Reaktion im gesamten Vorderhirn mit einer maximalen Sensitivität im Alter von 6 Tagen. In Hinblick auf die Ausdehnung und das zeitliche Auftreten nach dem Insult ist die zytotoxische Reaktion von NMDA identisch mit der Reaktion nach Hypoxie bzw. Ischämie. Mit zunehmendem Alter ist die ausgedehnte exzitotoxische Sensitivität gegen NMDA rückläufig, und die Läsionen sind zunehmend auf den Injektionssitus beschränkt. Im Alter von 2-10-Tagen korreliert die Verteilung der Neuronen, die empfindlich gegen NMDA-Toxizität sind, eng mit der Verteilung der durch Hypoxie oder Ischämie geschädigten Zellpopulationen.

Diese Untersuchungsergebnisse lassen vermuten, dass es eine bestimmte Phase in der Entwicklung gibt, in der NMDA-Rezeptoren sehr sensitiv gegenüber exzitatorischer Stimulation sind und die entsprechenden Neuronen überempfindlich auf hypoxisch-ischämische Noxen reagieren. Bei erwachsenen Tieren konnte gezeigt werden, dass NMDA-Antagonisten die exzitotoxische Neurodegeneration im Rahmen einer Ischämie und Hypoxie vermindern (52, 53).

1.7 Glutamat als trophischer Faktor

Yan *et al.* beschrieben, dass ein Mangel an Glutamat oder NMDA in Granulazellkulturen zu Apoptose führt. Auch der non-NMDA-Rezeptoragonist Kainat wirkt schützend vor Apoptose während der non-NMDA-Rezeptorantagonist 6-Cyano-7-nitrochinoxalin-2,3-dion (CNQX) den präventiven Effekt von Glutamat und NMDA hemmt. Sowohl die Aktivierung von NMDA- als auch von non-NMDA-Rezeptoren scheint also die Apoptoseneigung von Neuronen zu hemmen. Da die Zellen bei einer Überstimulation der Glutamatrezeptoren zu exzitotoxischer Neurodegeneration neigen, scheinen sie zum Überleben offensichtlich eine ausgewogene glutamaterge Stimulation zu benötigen, die weder zu gering, noch überschießend ist (54).

1.8 Problemstellung

Dieser proapoptotische Effekt konnte auch in einem Hirntraumamodell beobachtet werden. Die NMDA-Antagonisten (+)MK801 und CPP können bei erwachsenen Tieren exzitotoxische Schäden vermindern, die nach einem Schädel-Hirn-Trauma auftreten. Bei Jungtieren kommt es nach Perkussionstrauma in einem definierten insultnahen Bereich einer Hirnhemisphäre zu exzitotoxischen Zelluntergängen und in entfernteren Hirnregionen auch zu Apoptose (3). NMDA-Antagonisten wie (+)MK801 und CPP wirken zwar protektiv gegenüber den exzitotoxischen Primärschäden, die durch das Trauma ausgelöst werden, führen jedoch zu einer Potenzierung des apoptotischen Zelltodes (55).

Es stellte sich somit die Frage, ob eine alleinige Blockade des NMDA-Rezeptors im unreifen Rattengehirn apoptotische Nervenzelluntergänge hervorruft und ob es ein bestimmtes Zeitfenster in der Entwicklung des Gehirnes gibt, in dem dieser Schaden ausgelöst werden kann. Hierfür wurde 7 Tage alten Ratten der NMDA-Antagonist

(+)MK801 injiziert und die Apoptose im Gehirn mittels Kupfer-Silberfärbung und Elektronenmikroskopie untersucht. In einem zweiten Schritt wurde eine Entwicklungsstudie mit Ratten im Alter von 0-30 Tagen durchgeführt. Es sollte geklärt werden, in welchem Zeitfenster eine proapoptotische Wirkung von NMDA-Antagonisten auslösbar ist. GYKI 52466, ein AMPA-Glutamatrezeptorantagonist, wurde ebenfalls auf eine mögliche proapoptotische Wirkung im unreifen Rattengehirn untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

2.1.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um junge Albinoratten (Han-Wistar) im Alter von 0, 3, 7, 14, 21 und 30 Tagen, die für unser Labor vom BgVV Berlin (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Diedersdorfer Weg 1, 12277 Berlin) bezogen wurden. Die Versuchs- und Kontrolltiere waren bei jedem durchgeführten Versuch jeweils Wurfgeschwister. So konnte eine unterschiedliche Empfindlichkeit auf Medikamente durch große genetische Unterschiede möglichst gering gehalten werden. Für die Versuche wurden insgesamt 50 Tiere benötigt, 40 davon für die Versuche mit (+)MK801. Die Tiere eines Wurfes (6-10 Tiere) wurden zu ca. 2/3 auf die Therapiegruppe und zu 1/3 auf die Kontrollgruppe verteilt.

Die Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien zur Durchführung von Tierversuchen der *Society for Neuroscience* durchgeführt (56). Die Tierversuche wurden vom Landesamt für technische Sicherheit und Arbeitsschutz Berlin genehmigt.

2.1.2 Geräte

Die Hirne der Ratten wurden mit einem Vibratom der Fa. *Electron Microscopy Sciences*, (Typ: *OTS-3000-04 Tissue Slicer*) geschnitten. Hierbei wurden die zu schneidenden Hirnhälften nebeneinander auf einem Behälter aufgeklebt, der in einer Phosphatpufferlösung (PBS) lag. Der Behälter mit den Hirnhälften wurde mit wählbarer Vorschubgeschwindigkeit gegen eine horizontal oszillierende Klinge bewegt, die um ca. 17° gegen die Schnittfläche nach oben gekippt war. Nach jedem Schnitt wurde die Klinge per Knopfdruck um 70µm tiefer gefahren.

Ein Kühlaggregat derselben Firma (*Thermoelectric Refrigeration System*) hielt das Kühlbad auf einer Temperatur von 4°C.

2.1.3 Pharmaka und Chemikalien

2.1.3.1 Pharmaka

Zwei ionotrope Glutamaterezeptorantagonisten wurden in den Versuchen verwendet:

(+)MK 801 (=Dizocilpin, (+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a, d]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate) (Research Biochemicals International, Natick, MA 01760, USA), ein nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptorantagonist.

GYKI 52466 (=1-(4-Aminophenyl)-4-methyl-7,8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepin) (*RBI*), ein AMPA-Rezeptorantagonist.

2.1.3.2 Chemikalien

Phosphatpuffer PBS

Dieser wurde als 10-fach-Konzentrat angesetzt, das lange haltbar ist.

70 ml	1M monobasisches Natriumphosphat (Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, <i>Merck</i> , Darmstadt)
330 ml	1M dibasisches Natriumphosphat (di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, <i>Merck</i>)
180 g	NaCl
ad 2 l	Aqua bidest.

Zum Gebrauch wurde die Stammlösung 1:10 verdünnt und bei 4°C gekühlt.

PBS-Azid

Die gebrauchsfertige Phosphatpufferlösung PBS wurde mit 50 mg/100 ml (0,05%) NaN_3 (Natriumazid, *Sigma Chemical Co.*, St. Louis, MO 63178, USA) versetzt.

Paraformaldehyd 4%ig

Dieses wurde zur Perfusion stets frisch angesetzt (max. 2 Wochen haltbar).

Ca. 1 l Aqua bidest. wurde auf 60°C erhitzt,

2 Tbl.	NaOH (Natriumhydroxid-Plättchen, <i>Merck</i>) hinzu gegeben,
80 g	Paraformaldehyd (<i>Suchardt</i> , Hohenbrunn, Deutschland) wurde im Gemisch gelöst,
38 ml	1M monobasisches Natriumphosphat (s.o.) und
162 ml	1M dibasisches Natriumphosphat hinzugefügt.

Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Lösung mit 1M NaOH oder 1M HCl (*Merck*) auf einen pH-Wert von 7,3-7,4 titriert.

ad 2 l Aqua bidest. Nach dem Filtrieren wurde die Lösung bei 4°C gelagert.

Gelatine-Medium

1,5 g Gelatine wurde in
250 ml Aqua bidest. gelöst (zuvor auf ca. 50°C erhitzt) und auf Raumtemperatur abgekühlt.
0.15 g Kalium-Chrom-Sulfat wurde hinzugefügt
ad 500 ml Aqua bidest. Lösung wurde nach Filtration bei Raumtemperatur gelagert.

Agar

2.1.3.3 Lösungen für die modifizierte Kupfer-Silberfärbung nach de Olmos (57, 58)

Kupfer-Silber-Lösung

180 ml Aqua bidest., unter Rühren wurde hinzugefügt:
1,5 g AgNO₃ (Silbernitrat, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
3 ml 0,5%ige Kupfer-II-nitrat-Lösung (Cu(NO₃)₂·3H₂O)
15 ml 0,1%iges Allantoin (5-Ureidohydantoin, Sigma)
9 ml Boratpuffer (0,2M Borsäure mit 0,05M Natriumtetraborat bis zu einem pH-Wert von 8,5 titriert)
17 ml Ethanol absolut (Mallinckrodt Baker B.V., 7412 VA Deventer, Holland)
9 ml Pyridin (*Merck*)

Diese Lösung wurde auf 40°C aufgewärmt und wegen Empfindlichkeit vor Licht geschützt.

Aceton (*Merck*)

Silber-Diamin

24 g AgNO₃ (Silbernitrat) wurde in
120 ml Aqua bidest. gelöst und mit
60 ml 0,4%iger NaOH (die Lösung wurde braun) und
30 ml NH₄OH (Ammoniumhydroxid, *Sigma*) versetzt (die Lösung klarte auf).

Reduktionslösung

135 ml	Aqua bidest., unter Rühren wurde hinzugefügt:
15 ml	Ethanol absolut
180 µl	37%iges Formaldehyd (Sigma)
10,5 mg	Zitronensäure (Sigma)

Bleichlösung: 0,3%-iges Kaliumferrizyanid

0,45 g	$K_3Fe(CN)_6$ (Sigma) wurde in
150 ml	Aqua bidest. gelöst.

Stabilisierungslösung: 0,1%iges Natriumthiosulfat (Sigma)

0,2 g	$Na_2S_2O_3$ wurde in
200 ml	Aqua bidest. gelöst.

2.1.3.4 Methylgrün-Pyronin-Lösung für die Nissl-Färbung

9 ml	2%ige Methyl-Grün-Lösung (wässrig)
4 ml	2%iges Pyronin Y oder G
14 ml	Glycerol und
23 ml	Essigsäure-Puffer (pH 4,8) wurden unter Rühren gemischt.

2.1.3.5 TUNEL-Färbung: kommerzielles Kit

ApopTag®, *Oncor Appligene*, Heidelberg

2.1.3.6 Sonstiges

Als weitere Materialien wurden laborübliche Behälter, Kocher, Wagen etc. verwendet.

2.2 Versuche: Vorbereitung und Versorgung

Die Versuchstiere wurden nach Entzug vom Muttertier – je ein Wurf zusammen – in einem Brutkasten bei konstant 37°C gehalten und alle 6-8 h in Abhängigkeit vom Alter der Ratten mit halbisotonischer 5%-iger Glukoselösung (Pädiafusin II) s.c. versorgt. Die 3 Tage alten Tiere bekamen je 0,3-0,5 ml, die 7 Tage alten je 0,5 ml und die 14 Tage

alten je 0,7 ml Elektrolytlösung pro Dosis injiziert. Die 21 und 30 Tage alten Ratten erhielten Wasser aus der Flasche und Trockenfutter.

Die Tiere eines Wurfes wurden mit Nummern gekennzeichnet und gewogen. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Durchschnittsgewicht der Versuchs- und Kontrollgruppen ungefähr gleich verteilt war.

2.2.1 Pharmakonapplikation

Sieben Tage alten Ratten wurde intraperitoneal (i.p.) isotone Kochsalzlösung (Kontrolle) oder je 0,5mg/kg Körpergewicht der NMDA-Antagonist Dizocilpin ((+)MK801) zu den Zeitpunkten 0 (1. Gabe), 8 und 16 Stunden appliziert. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 10 ml/kg KG. Diese Dosis wurde angewendet, weil sie in früheren Experimenten mit 7 Tagen alten Ratten eine ausgeprägte apoptotische Neurodegeneration ausgelöst hatte. Nach 24 Stunden wurden die Tiere getötet. In der Entwicklungsstudie wurde ebenso mit den Tieren im Alter von 0, 3, 14, 21 und 30 Tagen verfahren.

In einem abschließendem Versuch erhielten 7 Tage alte Ratten 3 x 30 mg/kg des AMPA-Antagonisten GYKI 52466 i.p. zu den Zeitpunkten 0, 8 und 16 Stunden.

2.2.2 Narkose und Perfusion

Zur Perfusion wurden die Ratten zunächst mit einer Überdosis an 10%igem Chloralhydrat (0,1 ml/10g KG s.c.) narkotisiert. Der Arbeitsbereich wurde mit den notwendigen Instrumenten und einem Infusionssystem ausgestattet, bestehend aus heparinisiertem PBS (100 IE Heparin/100ml PBS) und Paraformaldehyd- Lösung (beides auf ca. 4°C gekühlt). Die Ratten wurden nach sicherer Narkose auf der Arbeitsfläche fixiert. Der Thorax wurde beidseits lateral durchtrennt, das Zwerchfell vom Rippenbogen scharf abgetrennt und das noch schlagende Herz stumpf freipräpariert. Der rechte Vorhof wurde breit eingeschnitten gefolgt von einem Einschnitt in die linke Herzkammer an der Herzspitze. Eine stumpfe Kanüle wurde vorsichtig durch die linke Herzkammer in die Aorta vorgeschoben und mit einer kleinen Klemme fixiert. Mit 10 ml heparinisiertem PBS wurde das Blut aus dem großen Kreislauf gespült: das Tier wurde blass und die Leber je nach Vorhofschnitt blutleer und gebläht. Anschließend wurde die Fixierung mit 10 ml Paraformaldehyd im Bolus eingeleitet. Nach Erfolg, der durch das Steifwerden des Tieres beobachtet werden konnte, wurde

es noch weitere 10 Minuten mit dem 4°C kalten Paraformaldehyd mit maximaler Geschwindigkeit infundiert.

2.2.3 Präparation und Einbettung

Der Kopf der perfundierten Ratte wurde vom Rumpf abgetrennt und die Kalotte mit einem sagittalem Hautschnitt freigelegt. Ohne das Hirn zu beschädigen wurde die Kalotte mit einem Sagittalschnitt und zusätzlichen Orthogonalschnitten eröffnet und das Gehirn mit einem Spatel aus der Schädelbasis herausgelöst.

Zur Konservierung wurden die Hirne zunächst in toto für 2-4 Tage in Paraformaldehyd bei 4°C gelagert und anschließend in einer Ausgussform mit einer Rasierklinge in vier Teile geschnitten:

Der erste Schnitt führte koronar durch die Mitte des Gehirns. Schließlich wurden das Kleinhirn und das Riechhirn vom Cerebrum abgetrennt. Die Präparate lagerten nochmals für 1-3 Tage in Paraformaldehyd, bevor sie in das antimikrobielle PBS-Azid überführt wurden, wo eine längere Lagerung möglich war.

Zur Einbettung wurde die benötigte Menge Agar abgemessen und unter Rühren zum Schmelzen aufgekocht und unter weiterem Rühren wieder auf ca. 40°C abgekühlt. Die Großhirnhälften wurden gleichzeitig für einige Minuten auf Laborpapier getrocknet. Anschließend wurden sie mit der Schnittfläche nach unten auf eine Petrischale aufgelegt, die auf ein Kühlelement gesetzt wurde, um die Hirnhälften an das Glas anfrieren zu lassen (ca. 2 Minuten). Der abgekühlte Agar wurde dann zügig in die Petrischale gegossen, bis alle Präparate komplett bedeckt waren. Die Schale wurde zum Verfestigen des Agars auf dem Kühlelement belassen. Aus dem Agar wurden dann Quader herausgeschnitten, die die einzelnen Präparateteile beinhalteten. Diese wurden wiederum in PBS-Azid gefüllten (beschrifteten) Gläsern bis zur weiteren Verarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.4 Vibratomschnitt

Die eingelegten Großhirn-Präparate wurden zum Trocknen mehrere Minuten auf Papier gelegt. Auf das sorgfältig gereinigte und getrocknete Vibratom-Tischchen wurde dünn Sekundenkleber aufgetragen und dieser mit einer Klinge geglättet. Die beiden in Agar eingebetteten Hirnhälften wurden mit der Schnittfläche nach unten nebeneinander auf

die präparierte Fläche gelegt und leicht angedrückt. Anschließend härtete der Kleber noch ca. 5 Minuten aus.

Pro Gehirn wurden je zwei beschriftete 24-Well-Platten auf Kühlelemente gestellt und jede mit PBS-Azid bzw. Paraformaldehydlösung gefüllt. Das Kühlsystem des Vibratoms wurde auf eine Solltemperatur von 4°C eingestellt und der Schlitten des Vibratoms mit PBS gefüllt. Der Präparatetisch wurde in die PBS-Lösung eingetaucht und eingespannt und die Hirnhälften in 70µm-Schritten geschnitten. Etwa jeder 7. Schnitt, entsprechend 490µm-Abständen von Schnittmitte zu Schnittmitte, wurde zur Silberfärbung für mindestens 4 Tage in 4%ige Paraformaldehydlösung überführt, der Rest zur TUNEL-Färbung oder als Reserve in PBS-Azid. Die Präparate wurden anschließend im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.2.5 Nissl-Färbung

Zur Ermittlung der gesamten Neuronendichte in verschiedenen Hirnarealen wurden die Präparate nach Nissl gefärbt. Hierzu wurden die Hirnschnittpräparate zunächst gewässert und mit Essigsäure-Puffer (pH 4,8) gespült. Schließlich wurden sie für 30 Minuten in der Methylgrün-Pyronin-Lösung (MGP) inkubiert. Danach wurden die Schnitte wieder mit Aqua bidest. gespült, auf Objektträger mittels Gelatine-Medium aufgetragen und mit aufsteigenden Alkoholkonzentrationen entwässert. Die Zellkerne stellten sich grün bis blau-grün und das Zellplasma rot dar (59, 60).

2.2.6 Silberfärbung nach de Olmos

Die Schnitte wurden schließlich mit der Silberimprägnierung nach de Olmos (58) gefärbt, die degenerierte Zellen markiert. Hierbei reagiert das Plasma der degenerierten Zellen mit dem Silbernitrat, das durch die durchlässig gewordene Zellmembran in die Zelle eindringen kann. Dazu müssen die verwendeten Gefäße möglichst frei von Anionen sein. Dies wurde durch Einweichen aller Glasgefäße in rauchender Salpetersäure für 15 min erreicht. Anschließend wurde jedes Gefäß gründlich mit Aqua bidest. ausgespült. Sämtliche Lösungen wurden frisch angesetzt, und für die Spülvorgänge wurde ausschließlich Aqua bidest. verwendet.

Alle zu färbenden Schnitte eines Tieres wurden in eine Petrischale überführt und drei mal gewaschen. Da die Silberlösungen lichtempfindlich sind, wurde die Inkubation im Dunkeln und die Arbeitsschritte unter Vermeidung direkten Lichts durchgeführt.

- 1.) Zunächst wurden die Schnitte für 1 Stunde bei 40°C in Kupfer-Silber-Lösung und dann ca. 48 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.
- 2.) Die Präparate wurden mit frischem Aceton für 3 Minuten gewaschen bevor
- 3.) erneut für 35 Minuten mit Silber-Diamin inkubiert wurde.
- 4.) Die Schnitte wurden für 1 Minute in Reduktionslösung geschwenkt und
- 5.) anschließend zwei mal mit Aqua bidest. gewaschen.
- 6.) Dann wurden sie in 3%igem Kaliumferrizyanid für ca. 2-3 Minuten gebleicht und
- 7.) wiederum zwei mal mit Aqua bidest. gespült,
- 8.) schließlich in 0,1%iger Natriumthiosulfatlösung für 1 min. stabilisiert und noch
- 9.) 3 mal mit Aqua bidest. gewaschen.

Die jetzt goldgelb gefärbten Hirnschnittpräparate wurden unter Verwendung von Gelatine-Medium auf Objektträger überführt und für 24 Stunden luftgetrocknet. Die Objektträger wurden mit graduell steigenden Alkoholkonzentrationen (70%iger Ethanol bis Ethanol absolut, zuletzt Xylol) entwässert und gedeckt. Die degenerierten Neuronen stellten sich dunkelbraun bis schwarz auf einem goldgelben Hintergrund dar.

2.2.7 TUNEL-Färbung

Charakteristischerweise wird bei der Apoptose die DNA in Fragmente gespalten, die sich jeweils um 200 Basenpaare unterscheiden und daher in der Gelelektrophorese ein typisches Leitemuster bilden. Gavrieli beschrieb eine histologische Färbungsmethode zur Darstellung solcher DNA-Fragmente, die TUNEL-Färbung (TUNEL = *terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling*) (61).

Dies ist eine Färbemethode zur Erkennung apoptotischer Zellen, da die terminale Deoxynucleotidyl-Transferase (tDT) die 3'OH-Enden der DNA-Fragmente mit biotinylierten Polydesoxyuridylnukleotiden verbinden, die ihrerseits über eine

avidengekoppelte Peroxidase die Farbreaktion vermittelt. Die Färbung wurde mit Hilfe des kommerziellen ApopTag®- Kits durchgeführt. Die hydrierten Proben wurden hierbei mit 0,002 %iger Proteinase K-Lösung 15 min. lang inkubiert und nach einigen Spülungen mit Aqua bidest., 3 %igem Methanol, PBS und Ausgleichspuffer für 1 Stunde bei 37°C mit terminaler Deoxynucleotidyl-Transferase inkubiert. Nach Stoppen der Reaktion mit dem Stop/Wash-Puffer und erneutem Spülen (PBS) wurden die Präparate für 30 min. in Anti-Dioxigenin-Peroxidase inkubiert. Nach erneutem Spülen wurde noch zwei mal für 10-15 min. mit 0,05 %iger Diaminobenzidin-(DAB) Lösung gefärbt und mit Methylgrün 10% für 2-5 min. gegengefärbt. Das Resultat waren dunkelbraune Kerne von allen Zellen, die DNA-Fragmentierung zeigten. Das Zytoplasma intakter Zellen wurde mit Methylgrün angefärbt.

2.2.8 Mikroskopische Untersuchung und Auszählung

Um systematische Fehler weitgehend auszuschließen, wurde die Dichte der degenerierten Neuronen durch eine unabhängige Person mittels einer fraktionierten stereologischen Dissektionsmethode (*unbiased stereological dissector method*) ermittelt (62): Hierzu wurde das zu untersuchende Hirn jedes Tieres in 16 Regionen mit einem fixen Zählrahmen von 50 x 50 µm Fläche unterteilt (Fraktionierung) und die Zellen in verschiedenen Fokussierungsebenen (stereologische Dissektion) des 70 µm dicken Schichtpräparates ausgezählt. Die ausgezählten Hirnregionen waren: CA 1 Hippocampus (CA 1 HPC), Gyrus dentatus (GD), laterodorsaler Thalamus (Thal ld), mediodorsaler Thalamus (Thal md), ventraler Thalamus (Thal v), ventromedialer Hypothalamus (Hypothal vm), Subiculum, Caudatum, jeweils Lamina II und IV des frontalen Kortex (Fr), parietalen Kortex (Par), cingulären Kortex (Cing) und retrosplenialen Kortex (Rspl). Die verschiedenen Hirnareale wurden mit Hilfe eines Atlanten des sich entwickelnden Rattengehirnes aufgefunden (63). Es wurden zufällig 8-10 Felder ausgesucht und die Anzahl der (degenerierten) Zellen pro mm³ ermittelt (Das Volumen konnte mit der bekannten Schichtdicke von 70 µm und der Fläche der Zählfelder von 50 x 50 µm bestimmt werden.).

Verschiedene Autoren vertreten die Meinung, die oben genannte TUNEL-Färbung sei zu unspezifisch zur Entdeckung apoptotischer Zellen. Unter anderem haben Charriaut-Marlange und Grasl-Kraupp in ihren Experimenten mit Neuronen und Hepatozyten gezeigt, dass auch nekrotische Zellen in der TUNEL-Färbung positiv reagieren können,

und vorgeschlagen, diesen Test nicht als alleinigen Nachweis für Apoptose zu verwenden (64, 65). Ishimaru hatte schon zuvor apoptotische von nekrotischen Neuronen morphologisch abgegrenzt (3) und mit der Elektronenmikroskopie eine zuverlässigere Methode zum Nachweis von apoptotischen Neuronen beschrieben. Daher führten wir zur Bestätigung der Apoptose in den untersuchten Hirnschnitten eine Elektronenmikroskopie durch. Dafür wurden die Hirne in einem Plastik-Medium eingebettet, was unter dem Lichtmikroskop und dem Elektronenmikroskop die Untersuchung und Beurteilung aus dem selben Block ermöglichte. Die Hirnschnittpräparate wurden graduell entwässert und in Araldit eingebettet. Es wurden 1µm dicke Schnitte angefertigt und mit Methylenblau/Azur II gefärbt. Für die Elektronenmikroskopie wurden interessante Areale auf ca. 1 x 2 mm zurechtgeschnitten und mit einem Ultramikrotom Schnitte von 60-70 nm angefertigt. Diese wurden auf ein Schlitzgitter aufgebracht, mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt und unter einem JEOL 100C Transmissionselektronenmikroskop untersucht (66).

2.2.9 Statistische Methoden

Aus den jeweiligen Wurfgruppen wurde aus der Dichte der degenerierten Zellen der jeweiligen Hirnregion der arithmetische Mittelwert ($MV = \text{mean value}$), und der Standardfehler ($SEM = \text{standard error of means}$) errechnet. Außerdem wurden die Abweichungen der Mittelwerte mit dem t -Test von Student für unverbundene Stichproben bei Normalverteilung auf Signifikanz überprüft. Das Signifikanzniveau P wurde bei 0,001 bzw. 0,01 gesetzt und t für die verschiedenen Freiheitsgrade bestimmt (67). Das für die beiden zu vergleichenden Gruppen errechnete T wurde mit t verglichen und bei $T > t$ ein signifikanter Unterschied festgestellt.

Um das gesamte Ausmaß an Nervenzelldegeneration bei verschiedenen Tieren vergleichen zu können, wurde ein Score aus der Summe aller Dichtewerte degenerierter Neuronen aus 16 Hirnregionen gebildet. Zur Erfassung eines signifikanten Unterschieds in der Entwicklungsstudie (Auswirkung von (+)MK801 in Abhängigkeit vom Entwicklungsalter der Ratten) wurde mit Hilfe der errechneten Gesamtscores eine einfaktorielle Varianzanalyse ($ANOVA = \text{one way analysis of variance}$) durchgeführt (68). So konnten die verschiedenen Altersgruppen auf einmal auf signifikante Mittelwertsunterschiede untersucht werden.

3. Ergebnisse

3.1 Massive Neurodegeneration im Gehirn 8 Tage alter Ratten nach Behandlung mit (+)MK801

7 Tage alte Ratten wurden mit 3 x 0,5 mg/kg (+)MK801 intraperitoneal (i.p.) oder mit isotoner Kochsalzlösung (Kontrolle) behandelt. Zur Bestimmung der gesamten Neuronenzahl in den jeweiligen Hirnregionen wurden die Hirnschnittpräparate der Kontrolltiere nach Nissl gefärbt. Bei der Auszählung variierte die Zahl der Neuronen in den untersuchten Hirnregionen zwischen 133.000/mm³ im ventralen Thalamus und 284.000/mm³ im Gyrus dentatus (Tabelle 2). Zum Nachweis der Nervenzelluntergänge wurden die Hirnschnitte mit der Methode nach de Olmos gefärbt. Hier stellten sich die degenerierten Neuronen dunkelbraun bis schwarz auf einem goldgelben Hintergrund dar. Die Strukturen des Kortex, der Basalganglien und der Thalami ließen sich anhand dunklerer goldbrauner Farbschattierungen gut von der weißen Substanz unterscheiden, die sich heller darstellte, was die Orientierung in den einzelnen Hirnarealen vereinfachte. Schon bei geringer Vergrößerung der Hirnschnittpräparate waren deutliche Unterschiede zwischen den Tieren zu erkennen, die mit (+)MK801 und jenen, die mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt wurden.

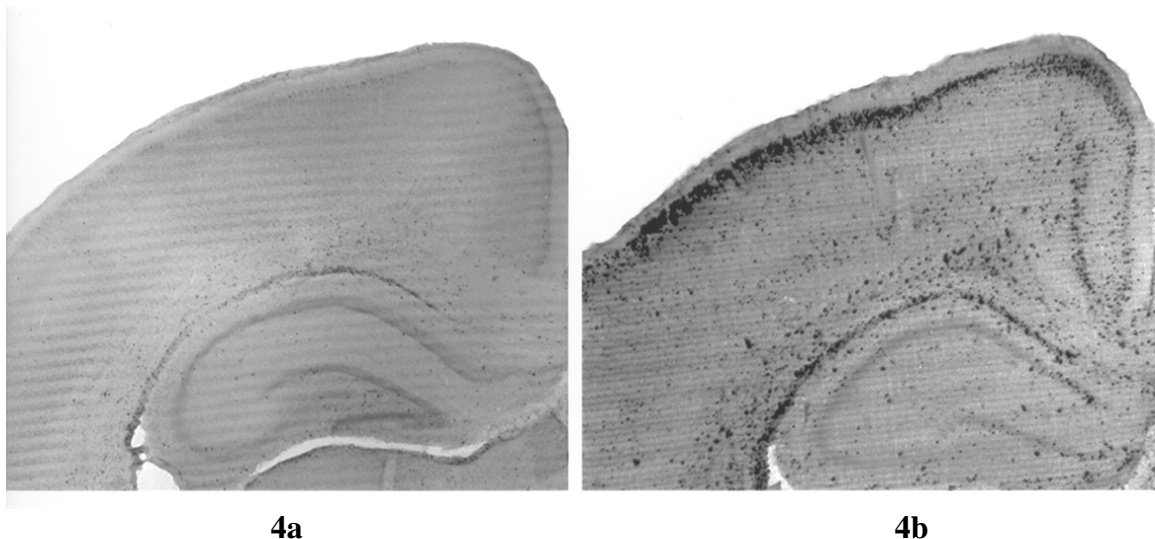


Abbildung 4a und b. Histologische Präparate von Hirnhemisphären im Koronarschnitt (Schwarz-Weiß-Aufnahme) acht Tage alter Ratten, 24 Stunden nachdem sie mit isotoner Kochsalzlösung (4a) oder (+)MK801 (3 x 0,5 mg/kg KG) behandelt wurden (4b). Vergrößerung 9,8fach. Die degenerierten Neuronen sind als dunkle Flecken auf hellem Hintergrund zu erkennen. Die Hirne der mit (+)MK801 behandelten Tiere zeigen in der Übersicht eine höhere Rate an degenerierten Neuronen als die Kontrolltiere. Insbesondere ist dies im parietalen und cingulären Kortex sichtbar.

In der 98fachen Vergrößerung waren die degenerierten Neuronen einzeln zu erkennen und konnten mithilfe des oben beschriebenen Zählrahmens quantifiziert werden (Abbildung 4 und Abbildung 5).

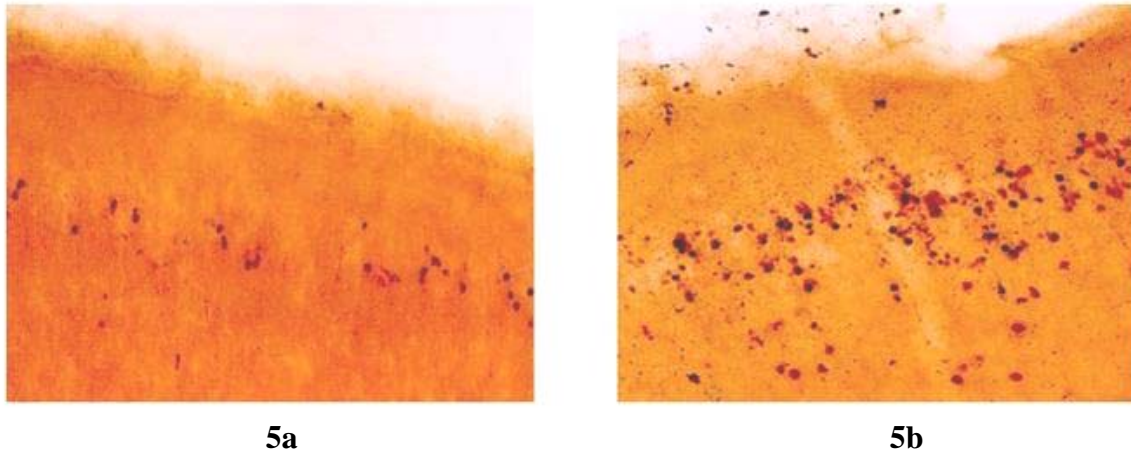


Abbildung 5a und b. Hirnschnittpräparate acht Tage alter Ratten, 24 Stunden nachdem sie mit isotoner Kochsalzlösung (5a) oder (+)MK801 (3 x 0,5 mg/kg KG) behandelt wurden (5b). De Olmos-Färbung, Vergrößerung 98fach. In der höheren Vergrößerung (Detailaufnahme aus Lamina II des Kortex parietalis) sind die degenerierten Neuronen einzeln zu erkennen. Nach Behandlung mit (+)MK801 sieht man eine deutliche Zunahme der degenerierten Neuronen im selben Hirnareal.

Die Ratten, die mit isotoner Kochsalzlösung behandelt wurden, wiesen wenige verstreute degenerierte Neuronen (physiologische Apoptose) im Prosencephalon auf.

Die Dichte degenerierter Neuronen variierte bei den Kontrolltieren zwischen $284/\text{mm}^3$ (0,2% der Gesamtneuronendichte der untersuchten Hirnregionen) in Lamina IV des frontalen Kortex und $3.400/\text{mm}^3$ (1,55%) in Lamina II des frontalen Kortex. Bei den Ratten, die mit (+)MK801 behandelt wurden, kam es in spezifischen Regionen zu einer deutlichen Erhöhung der Zahl degenerierter Neuronen (Tabelle 2).

(+)MK801 verursachte eine Dichteerhöhung degenerierter Neuronen von etwa 3,3-fach im Hypothalamus (von $1.210/\text{mm}^3$ auf $4.000/\text{mm}^3$) bis zu 39,7-fach im laterodorsalen Thalamus (von $401/\text{mm}^3$ auf $15.920/\text{mm}^3$) mit Anteilen von 15-26% der gesamten Neuronenzahl in diesen Hirnregionen (besonders in der Lamina II des parietalen, frontalen und cingulären Kortex). In zwei weiteren Hirnarealen, nämlich im Subiculum und in der Lamina II des retrosplenialen Kortex, stieg der Anteil degenerierter Zellen von $1.170/\text{mm}^3$ - $2.100/\text{mm}^3$ (0,6 - 0,9%) auf ca. $21.200/\text{mm}^3$ - $27.110/\text{mm}^3$ (10,7 - 12%) an. Insgesamt war die Lamina II der verschiedenen Kortexareale am stärksten betroffen, aber in allen untersuchten Hirnregionen war der Anteil degenerierter Neuronen deutlich gegenüber der spontanen Degenerationrate erhöht (Abbildung 6).

Tabelle 2: Die Apoptoserate im Hirn von 7 Tage alten Ratten wird durch den NMDA-Antagonisten (+)MK801 erhöht. Die Ratten erhielten entweder Placebo oder (+)-MK801 (0,5 mg/kg KG i.p.) nach 0, 8 und 16 Stunden und wurden nach 24 Stunden (P8) getötet. Durch die o.g. optische Unterteilungsmethode wurde jeweils in 16 Hirnregionen die Dichte der Gesamtzellzahl (in Zellen/mm³, in den nach Nissl gefärbten Hirnpräparaten) bzw. der degenerierenden Zellen (in %- Anteil der Gesamtzellzahl, de Olmos-Färbung) mit dem jeweiligen Standardfehler des Mittelwerts (\pm SEM) ermittelt. Die Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Tieren wurde mittels t-Test von Student auf Signifikanz überprüft. Die Asterices geben das Signifikanzniveau an: **P<0,01; ***P<0,001. CA 1 HPC: CA 1 Hippocampus, GD: Gyrus dentatus, Thal Id: laterodorsaler Thalamus, Thal md: mediodorsaler Thalamus, Thal v: ventraler Thalamus, Hypothal vm: ventromedialer Hypothalamus, Fr: frontaler Kortex, Par: parietaler Kortex, Cing: cingulärer Kortex, Rspl: retrosplenialer Kortex, jeweils Lamina II und IV.

Hirnregion	Kontrolle		(+)MK801
	numerische Zelldichte (gesamt) pro mm ³ \pm SEM	degenerierte Zellen pro Zelldichte in % \pm SEM	degenerierte Zellen pro Zelldichte in % \pm SEM
CA 1 HPC	220.050 \pm 4.584	0,85 \pm 0,11	3,35 \pm 0,7***
GD	284.127 \pm 23.089	0,37 \pm 0,06	1,75 \pm 0,3***
Subiculum	198.124 \pm 8.205	0,59 \pm 0,04	10,70 \pm 1,7***
Caudatum	242.534 \pm 11.140	0,29 \pm 0,04	4,77 \pm 0,9***
Thal Id	133.945 \pm 13.148	0,30 \pm 0,05	11,91 \pm 2,2***
Thal md	199.335 \pm 6.398	0,40 \pm 0,01	2,39 \pm 0,3***
Thal v	132.907 \pm 2.634	0,76 \pm 0,05	2,77 \pm 0,7**
Hypothal vm	134.500 \pm 2.343	0,90 \pm 0,01	2,98 \pm 0,7**
Fr II	219.432 \pm 4.541	1,55 \pm 0,18	22,65 \pm 1,9***
Fr IV	142.120 \pm 10.323	0,20 \pm 0,05	1,43 \pm 0,2***
Par II	223.900 \pm 13.434	1,08 \pm 0,28	26,13 \pm 2,5***
Par IV	156.078 \pm 6.323	0,22 \pm 0,05	1,72 \pm 0,3***
Cing II	218.932 \pm 11.239	1,54 \pm 0,21	15,49 \pm 1,8***
Cing IV	148.100 \pm 6.125	0,13 \pm 0,03	3,22 \pm 0,9***
Rspl II	235.948 \pm 13.857	0,89 \pm 0,07	11,49 \pm 1,8***
Rspl IV	143.250 \pm 10.857	0,33 \pm 0,08	5,95 \pm 0,4***

Die Untersuchung der beiden Zahlenreihen mit dem Student *t*-Test für unverbundene Stichproben mit Normalverteilung zeigte, dass die Mittelwerte für die degenerierten Zellen sich signifikant unterscheiden (P<0,001, in Tabelle 2 mit *** markiert). Nur im

ventralen Thalamus und ventromedialen Hypothalamus wurde das Signifikanzniveau P für den Student t -Test mit $<0,01$ (in Tabelle 2 mit ** markiert) gewählt.

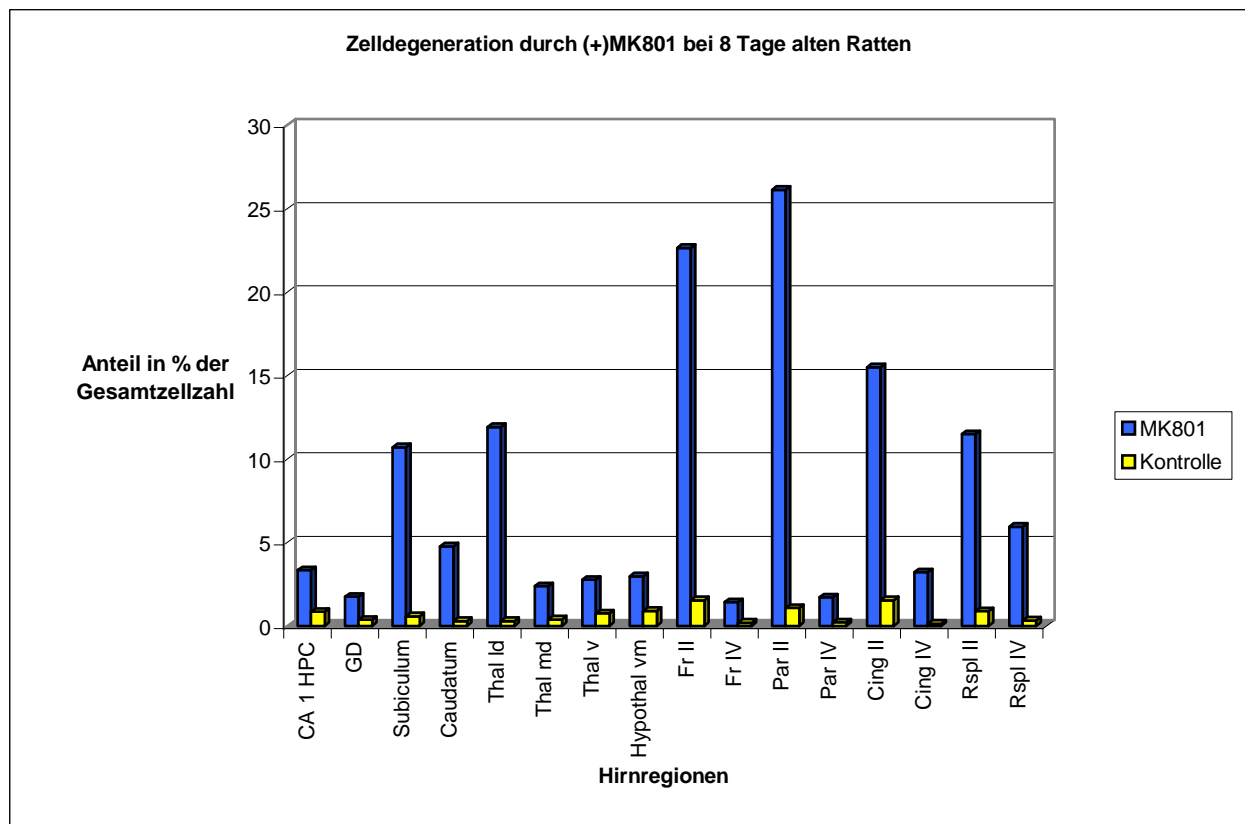


Abbildung 6. Graphische Darstellung der Anteile degenerierter Neuronen bei Tieren, die mit dem NMDA-Rezeptorantagonisten (+)MK801 behandelt wurden (dunkle Säulen), im Vergleich zur spontanen Degenerationsrate (physiologische Apoptose, helle Säulen) in verschiedenen Hirnarealen. Auf der Abszissenachse sind die Hirnareale dargestellt: CA 1 HPC: CA 1 Hippocampus, GD: Gyrus dentatus, Thal Id: laterodorsaler Thalamus, Thal md: mediodorsaler Thalamus, Thal v: ventraler Thalamus, Hypothal vm: ventromedialer Hypothalamus, Fr: frontaler Kortex, Par: parietaler Kortex, Cing: cingulärer Kortex, Rspl: retrosplenialer Kortex, jeweils Lamina II und IV. Auf der Ordinatenachse wurden die jeweiligen prozentualen Anteile der degenerierten Zellen an der Gesamtzellzahl von Neuronen in den Hirnarealen dargestellt. Insbesondere die Lamina II der frontalen, parietalen und cingulären Cortices zeigen hohe durch (+)MK801 induzierte Apoptoseraten.

3.2 TUNEL-Färbung und Elektronenmikroskopie zum Nachweis der apoptotischen Natur der Neurodegeneration

Die lichtmikroskopisch untersuchten Zellen, die sich in einem frühen Stadium der Degeneration befanden, wiesen morphologische Charakteristika von Neuronen auf mit Perikarya, Axonen und teilweise sichtbaren Dendriten.

Die Untersuchung TUNEL-gefärbter histologischer Schnitte 8 Tage alter Ratten, die 24h zuvor mit (+)MK801 oder isotonischer Kochsalzlösung behandelt wurden, zeigte im Vergleich mit der Färbemethode nach de Olmos, dass in denselben Arealen TUNEL-positive Neuronen angefärbt wurden, in denen auch in der de Olmos-Färbung degenerierte Neuronen gefunden wurden. Die jeweiligen Dichten degenerierter Neuronen waren sowohl in den Placebo- als auch in den Verum-Gruppen in beiden Färbemethoden vergleichbar. Da die TUNEL-Färbung Zellen mit fraktionierter DNA anfärbt, wie sie typischerweise bei Apoptose vorkommen, nahmen wir an, dass es sich bei den betroffenen Neuronen um apoptotische Zellen handelte (Abbildung 7a und b).

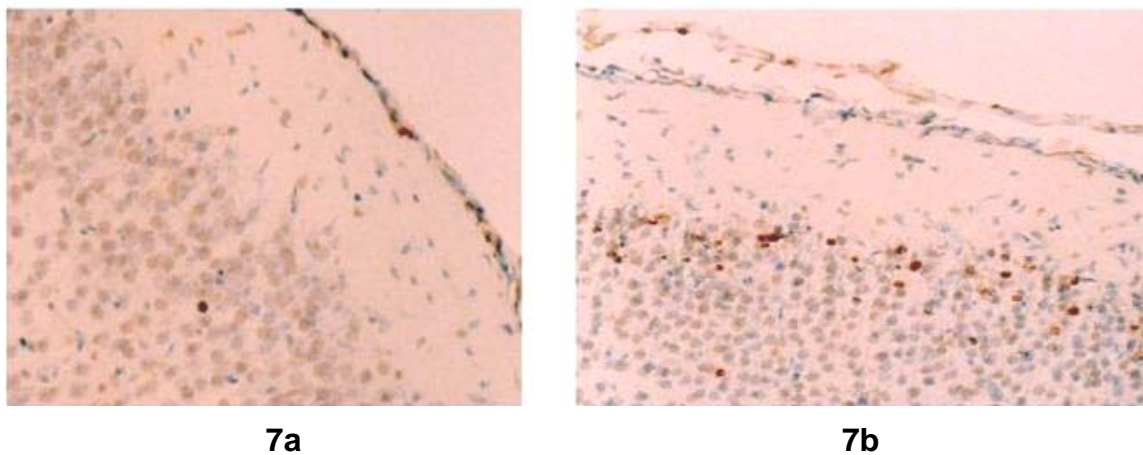


Abbildung 7a-b. Hirnschnittpräparate mit Detailansicht der Lamina II des Cortex parietalis 8 Tage alter Ratten, 24 Stunden nachdem sie entweder mit isotonischer Kochsalzlösung (3a) oder mit (+)MK801 (3 x 0,5 mg/kg KG) (3b) behandelt wurden. TUNEL-Färbung, Vergrößerung 98-fach. Die apoptotischen (TUNEL-positiven) Neuronen stellen sich als (dunkel-)braune Zellen dar. Bei den Kontrolltieren sieht man vereinzelt TUNEL-positive Zellen, während bei den mit (+)MK801 behandelten Tieren eine deutliche Zunahme des Zelluntergangs zu sehen ist. Dies entspricht dem Bild bei der Färbung nach de Olmos (siehe Abb. 1c-d).

Der endgültige Beweis der apoptotischen Natur der Zelluntergänge konnte mit der Elektronenmikroskopie erbracht werden. Es zeigte sich, dass sich der hier gefundene degenerative Prozess ultrastrukturell nicht vom physiologischen Zelltod unterscheidet, der im gesunden sich entwickelnden Gehirn vorkommt. Die Neuronen zeigten typische Charakteristika der Apoptose wie Zellschrumpfung, Chromatinkondensation und -aggregation an der Zellkernperipherie in der frühen Phase. In einer späteren Phase der Zelldegeneration zeigten die Neuronen neben der fortschreitenden nukleären Chromatinkondensation das so genannte Blebbing, also ein Abschnüren von Zellbestandteilen, die von Plasmalemm umgeben sind. Diese morphologischen

Merkmale wurden sowohl bei den Tieren gefunden, die mit isotonischer Kochsalzlösung behandelt wurden, als auch bei jenen, die (+)MK801 erhielten (Abbildung 8a-d).

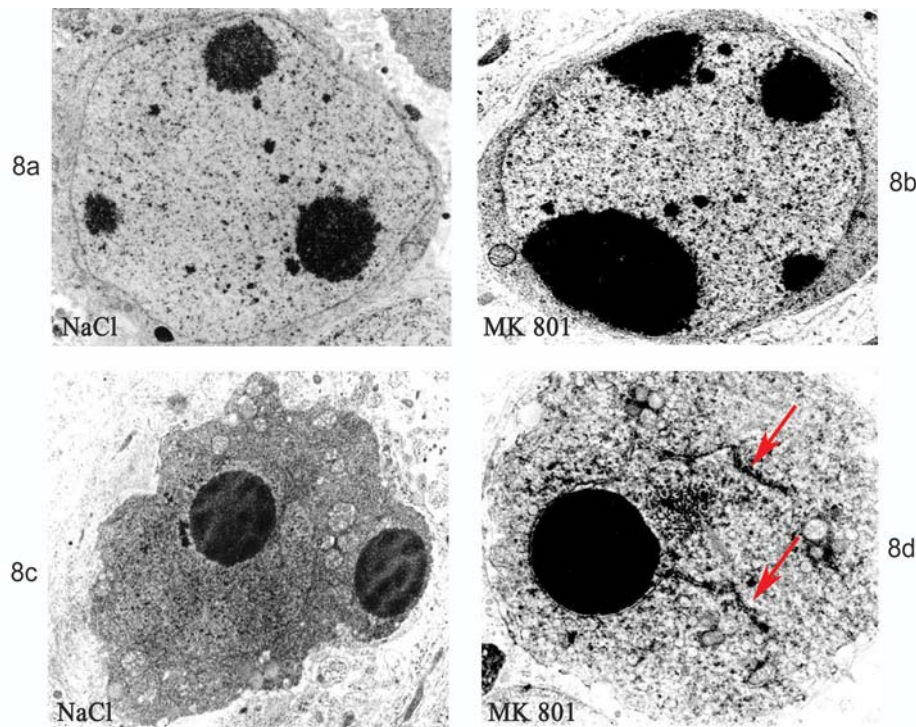


Abbildung 8a-d. Elektronenmikroskopische Aufnahmen einzelner degenerierter Neuronen von 8 Tage alten Ratten, 24 Stunden nachdem sie mit isotonischer Kochsalzlösung (8a und 8c) oder mit (+)MK801 (3 x 0,5 mg/kg KG) (8b und 8d) behandelt wurden. Vergrößerung 3.275-fach. Die ultrastrukturellen Veränderungen, die hier zu sehen sind, treten charakteristischerweise bei Neuronen auf, die programmierten Zelltod durchlaufen. Die Abbildungen 8a und 8b zeigen ein frühes Stadium der Apoptose mit Chromatinkondensation im Nucleus bei noch intakter Zellkernmembran. In den Abbildungen 8c und 8d sieht man ein späteres Stadium der Apoptose, wo die Chromatinkondensation weiter fortgeschritten ist und die Zellkernmembran fragmentiert (Pfeile) und diskontinuierlich erscheint. Diese Aufnahmen wurden in der Abteilung der Psychiatrie an der Washington University, St. Louis, USA angefertigt und von Prof. J. Olney freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.3 Entwicklungsstudie: Höchste Apoptoserate im Alter von 7 Tagen nach Gabe von (+)MK801

In der Entwicklungsstudie wurden die Unterschiede der Apoptoseraten in den verschiedenen postpartalen Altersstufen 1 bis 31 Tage untersucht (P1, P4, P8, P15, P22 und P31), jeweils 24 Stunden nachdem die Behandlung mit (+)MK801 oder physiologischer Kochsalzlösung begonnen wurde. Die Dichten apoptotischer Zellen wurden in mehreren Hirnarealen bestimmt und zum Vergleich der verschiedenen Altersgruppen zu einem Score zusammengezählt. Im Alter von 1 bis 15 Tagen löste (+)MK801 apoptotische Nervenzelluntergänge aus, aber das Verteilungsmuster war abhängig vom Entwicklungsalter der Tiere. Die Sensibilität gegenüber (+)MK801-

induzierter Apoptose war an P1 und P4 hoch, stieg zwischen P4 und P8 an und fiel steil zwischen P8 und P15 ab. Am 22. postpartalen Tag wurden bei placebobehandelten Ratten keine apoptotischen Neuronen gefunden und nur in geringer Anzahl bei Ratten, die mit (+)MK801 behandelt wurden. 31 Tage alte Ratten hatten weder in der Placebo-, noch in der Verum-Gruppe apoptotische Zelluntergänge (Abbildung 9).

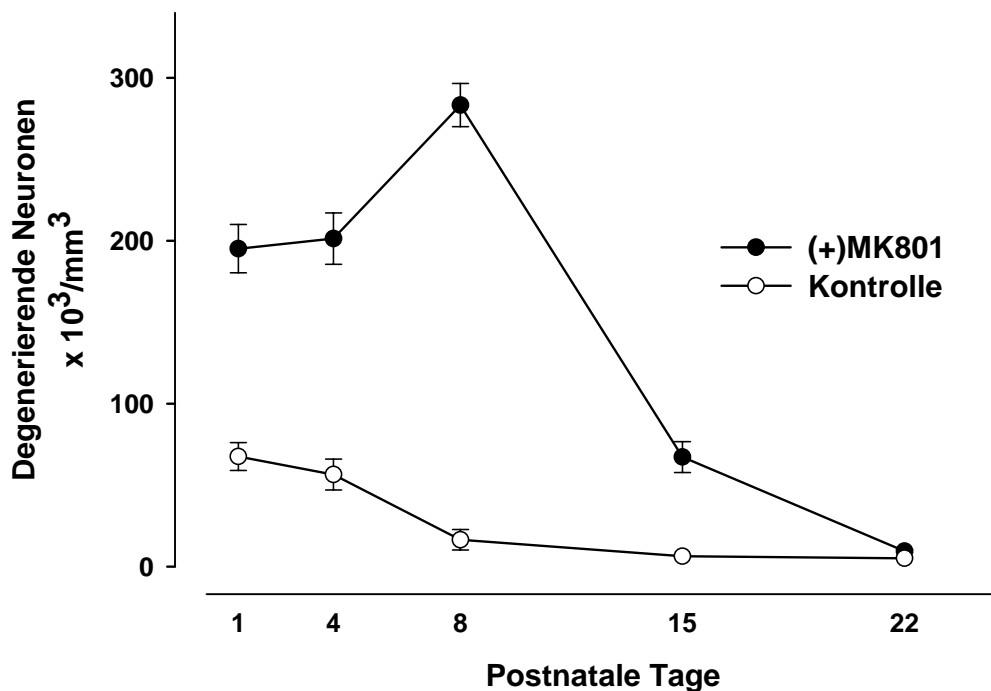


Abbildung 9. Apoptose-Score des gesamten Gehirns verschiedener Altersgruppen. Die Ratten erhielten 3 x 0,5 mg/kg KG (+)MK801 (dunkle Kreise) oder isotonischer Kochsalzlösung (offene Kreise) in den verschiedenen postnatalen Altersstufen (P0-P21) und wurden nach 24 Stunden getötet (P1-P22). Die Dichten apoptotischer Neurone in 16 verschiedenen Hirnarealen wurden zu einem Score aufsummiert und hier graphisch dargestellt. In allen Altersstufen, P1 bis P22, induziert (+)MK801 Zelluntergänge. Diese sind hoch an P1 und P4, erfahren ein Maximum an P8 und nehmen mit zunehmender Gehirnentwicklung wieder ab. Im Vergleich dazu nimmt die spontane Apoptoserate nach der Geburt kontinuierlich ab.

Die Erhöhung der Apoptoserate mit zunehmendem Alter bis zum 8. Lebenstag fand aber nicht gleichmäßig im gesamten Gehirn statt. Vielmehr unterschieden sich die Verteilungsmuster apoptotischer Neurodegeneration in den verschiedenen Altersgruppen voneinander (Abbildung 10). Die spontane Apoptose bei den neugeborenen Ratten (P1) fand in den mediodorsalen und ventralen thalamischen Nuklei statt, besonders stark ausgeprägt war sie aber im ventromedialen Hypothalamus und im Nucleus caudatus (Caudatum). Die Hirnregionen, die direkt postpartal (P1) eine nennenswerte spontane Apoptoserate aufwiesen, zeigten auch eine kräftige

apoptotische Antwort auf (+)MK801, welche am stärksten im Gyrus dentatus war (17fache Erhöhung gegenüber der spontanen Apoptoserate). Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Altersgruppen wurden sowohl bei Placebo-, als auch bei (+)MK801-behandelten Tieren an P0 keine apoptotischen Veränderungen im zerebralen Kortex gefunden.

Tabelle 3: Spontane und (+)MK801-induzierte Apoptoseraten in Abhängigkeit vom Alter. Ratten im Alter von 0, 3 und 7 Tagen erhielten entweder 3 x 0,5 mg/kg KG (+)MK801 oder isotone Kochsalzlösung und wurden nach 24 Stunden getötet. Das Gehirn der Tiere wurde mittels der Olmos-Färbung gefärbt und in 14 verschiedenen Hirnregionen histologisch auf Neurodegeneration untersucht. Dargestellt sind die numerischen Dichten apoptotischer Neuronen pro Kubikmillimeter (N/mm^3) \pm SEM (standard error of means = Standardfehler). Die in Klammern angegebenen Zahlen geben den Faktor der Zunahme der Apoptoseraten in den jeweiligen Hirnarealen nach Gabe von (+)MK801 wieder.

Alter	P1		P4		P8	
	Kontrolle	(+)MK801	Kontrolle	(+)MK801	Kontrolle	(+)MK801
Hirnregion	$N/mm^3 \pm$ SEM	$N/mm^3 \pm$ SEM	$N/mm^3 \pm$ SEM	$N/mm^3 \pm$ SEM	$N/mm^3 \pm$ SEM	$N/mm^3 \pm$ SEM
CA 1 HPC	3.786 \pm 305	21.648 \pm 1.917 (5,7)	4.576 \pm 756	20.107 \pm 1.690 (4,4)	1.863 \pm 242	7.180 \pm 1.549 (3,9)
DG	4.796 \pm 716	83.786 \pm 1.397 (17,5)	2.745 \pm 420	14.288 \pm 1.043 (5,2)	1.045 \pm 170	4.990 \pm 978 (4,8)
Subiculum	3.996 \pm 459	25.589 \pm 2.331 (6,4)	3.663 \pm 760	29.266 \pm 3.048 (8)	1.168 \pm 172	21.199 \pm 3.368 (18,1)
Caudatum	8.349 \pm 915	36.790 \pm 3.207 (4,4)	4.359 \pm 740	19.654 \pm 1.268 (4,5)	703 \pm 97	11.569 \pm 2.183 (16,5)
Hypothal vm	23.186 \pm 2.309	92.669 \pm 20.285 (4)	1.835 \pm 270	8.059 \pm 987 (4,4)	1.209 \pm 14	4.008 \pm 941 (3,3)
Thal Id	2.428 \pm 423	4.756 \pm 1.487 (2)	3.172 \pm 756	31.555 \pm 4.510 (9,9)	402 \pm 67	15.939 \pm 2.944 (39,6)
Thal md	18.824 \pm 2.078	31.796 \pm 2.804 (1,7)	926 \pm 85	3.295 \pm 414 (3,6)	768 \pm 20	4.598 \pm 598 (6)
Thal v	10.787 \pm 693	20.443 \pm 2.700 (1,9)	1.156 \pm 205	3.396 \pm 582 (2,9)	1.003 \pm 66	3.682 \pm 930 (3,7)
Fr II	0	0	5.672 \pm 750	33.412 \pm 4.667 (5,9)	3.398 \pm 395	49.701 \pm 4.169 (14,6)
Par II	0	0	5.291 \pm 905	34.286 \pm 3.461 (6,5)	2.421 \pm 602	58.505 \pm 555 (24,2)
Cing II	0	0	9.242 \pm 1.200	11.548 \pm 272 (1,2)	3.369 \pm 445	33.913 \pm 3.941 (10,1)
Cing IV	0	0	3.065 \pm 518	3.206 \pm 63 (1)	196 \pm 44	4.769 \pm 1.332 (24,3)
Rspl II	0	0	5.320 \pm 445	6.009 \pm 57 (1,1)	2.089 \pm 159	27.110 \pm 4.247 (13)
Rspl IV	0	0	2.104 \pm 482	2.287 \pm 23 (1,1)	476 \pm 115	8.523 \pm 573 (17,9)

An Tag P4 sank die Rate der spontanen Apoptose im Hypothalamus und in den mediodorsalen und ventralen thalamischen Kernen merklich, blieb auf einem mäßig hohen Niveau in den meisten anderen Regionen und zeigte sich erstmals in neuen Regionen, wie z.B. in der Lamina II der frontalen, parietalen, cingulären und retrosplenialen Anteile des zerebralen Kortex. In dieser Entwicklungsphase löste (+)MK801 in allen untersuchten Regionen eine erhöhte Apoptoserate aus, besonders im Subiculum (8fach) und im laterodorsalen Thalamus (10-fach).

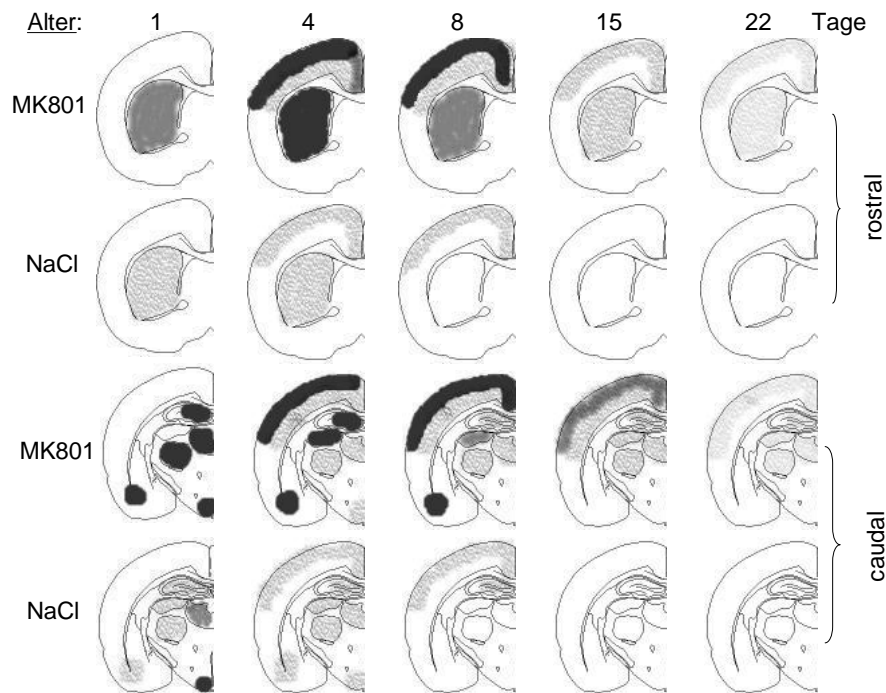


Abbildung 10. Schemata von Hirnschnitthemisphären im Alter von 1 bis 22 Tagen mit graphischer Kennzeichnung der Hirnareale, in denen neuronale Apoptose stattfindet. In den hellgrauen Feldern liegen Apoptoseraten von bis zu 10.000/mm³ vor, in den mittelgrauen Apoptoseraten von 10.000-20.000/mm³ und in den dunklen Arealen mehr als 20.000/mm³.

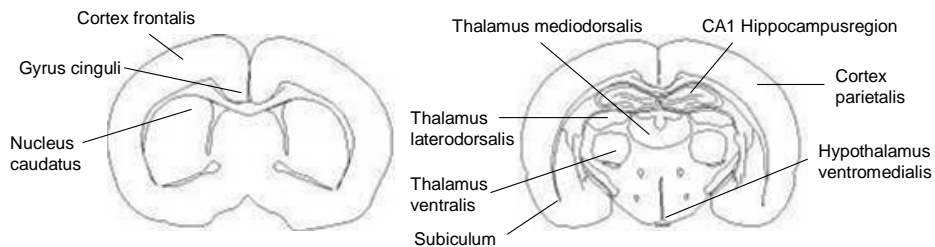


Abbildung 11. Schema der untersuchten Hirnregionen. Im linken Bild sieht man einen rostralen, rechts einen caudalen Koronarschnitt durch das junge Rattengehirn.

Am 8. postpartalen Tag (P8) sank die spontane Apoptoserate in allen Regionen auf ein mäßiges Niveau, aber die (+)MK801-induzierten Potenzierungen der Apoptose blieben in vielen Regionen hoch (14,6- bis 39,7fache Erhöhung gegenüber der spontanen Apoptoserate im frontalen Kortex, Subiculum, retrosplenialen, parietalen und cingulären Cortices und im laterodorsalem Thalamus). Regionen, die direkt postpartal (P1) hohe spontane oder induzierte Apoptoseraten aufwiesen (Gyrus dentatus, CA1 Hippocampus, ventromedialer Hypothalamus und ventraler und mediodorsaler Thalamus), zeigten dagegen an P8 niedrige spontane und induzierte Apoptoseraten (Tabelle 3). An P15 nahm die durch (+)MK801 induzierte Apoptoserate auf etwa ein Viertel der Rate bei 8 Tage alten Tieren ab, besaß aber ein ähnliches Verteilungsmuster. An P22 reduzierte sich die induzierte Apoptoserate nochmals um ca. die Hälfte. Bei den beiden ältesten untersuchten Altersgruppen war die Rate der induzierten Apoptose jeweils 20- bis 50-fach gegenüber der jeweiligen spontanen Apoptoserate erhöht.

3.4 Hemmung von AMPA- Rezeptoren: keine Erhöhung der Apoptoserate

Zum Schluss wurde untersucht, ob der non-NMDA-Rezeptorantagonist GYKI 52466 (ein AMPA-Rezeptorblocker) ebenfalls Apoptose auslösen kann. Hierfür erhielten 7 Tage alte Ratten entweder eine oder drei Dosen à 30 mg/kg KG des AMPA-Antagonisten. Die histologischen Untersuchungen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren, die mit isotoner Natriumchloridlösung behandelt wurden, und denen, die GYKI 52466 erhalten hatten.

4. Diskussion

4.1 Allgemeines

Eine vorübergehende Blockade von NMDA-Rezeptoren im sich entwickelnden Gehirn von Ratten verursacht bei sensiblen Neuronen einen Zelluntergang, der mittels deOlmos Kupfer-Silber-Färbung und TUNEL-Färbung nachgewiesen werden konnte. Die Kupfer-Silber-Färbung stellt hierbei degenerierende Neuronen dar, unabhängig von der Genese des Zelltodes, während die TUNEL-Technik konzipiert ist, spezifisch apoptotische Zellen anzufärben (61). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich um einen Zelluntergang apoptotischer Natur handelt, da Zellpopulationen, die in der Silberfärbung nach deOlmos angefärbt wurden, auch mittels TUNEL-Färbung nachgewiesen werden konnten. Es wurde jedoch häufiger infrage gestellt, ob diese Methode spezifisch apoptotisch degenerierende Neuronen entdecken lässt (3, 64, 65). Als Grund für falschpositive oder negative Ergebnisse wurde unter anderem die Variabilität der Färbeergebnisse aufgrund verschiedener Techniken bei der Präparateherstellung angegeben (69). Außerdem könnten eine aktive RNA-Synthese und DNA-Fragmentierung nekrotischer Zellen eine nichtspezifische Färbung erklären. Aufgrund dieser Kontroversen in der Anwendbarkeit der TUNEL-Färbung wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Olney, St. Louis, USA, eine morphologische Untersuchung ausgewählter Hirnschnittareale mittels Elektronenmikroskopie durchgeführt. Hierbei wurden spezifische Charakteristika für apoptotischen Zelltod gefunden, wie sie auch typischerweise beim physiologischen Zelltod von Neuronen vorkommen (3). Es kam es spontan und nach Applikation von (+)MK801 zu Chromatinkondensation und Fragmentierung der Zellkernmembran bei intakter Zellmembran, noch bevor Veränderungen an Zellorganellen auszumachen waren. Diese Entdeckung war letztendlich beweisend für die apoptotische Genese des Nervenzelluntergangs im Hirn dieser Ratten.

Der proapoptotische Effekt von (+)MK801 auf Neuronen von Ratten ist abhängig von deren Entwicklungsalter und am stärksten am achten Lebenstag ausgeprägt. Neuronale Apoptose konnte durch den AMPA-Rezeptor-Antagonisten GYKI 52466 nicht ausgelöst werden, was für die Spezifität der NMDA-Rezeptoren bei der Apoptoseinduktion spricht. Ähnliche Ergebnisse wurden auch *in vitro* mit zerebellären Körnerzellen und kortikalen Neuronen gezeigt, wo diese nach Blockade des NMDA-Rezeptors apoptotischen Zelltod erlitten (54, 70).

Es ist anzunehmen, dass Neuronen eine kritische Phase der Entwicklung durchmachen, in der sie stark von der Glutamat-Stimulation über NMDA-Rezeptoren abhängen. Eine anhaltende Deprivation dieses Inputs in diesen Zellen aktiviert den programmierten Zelltod.

4.2 Abhängigkeit der Apoptoseinduktion vom Entwicklungsalter

In der Entwicklungsstudie fiel auf, dass jede Hirnregion ihr individuelles Vulnerabilitätsprofil in Abhängigkeit vom Lebensalter zeigt (71). Zentrale Hirnareale wie die thalamischen Kerngebiete, der *Nucleus caudatus* und der Hippocampus erlitten bereits postnatal eine apoptotische Neurodegeneration nach Gabe von NMDA-Antagonisten, während die kortikalen Areale in dieser Zeit völlig unempfindlich waren. Am dritten Lebenstag nahm die Stärke der apoptotischen Antwort in thalamischen Kerngebieten weiter zu, und im Kortex trat erstmals Apoptose nach (+)MK801-Applikation auf. Die Empfindlichkeit im Hippocampus nahm dann deutlich ab, und erst am siebten Lebenstag zeigten die kortikalen Areale eine maximale apoptotische Reaktion auf den NMDA-Antagonisten. In diesem Alter war der Hippocampus in der CA1 Region und der *Gyrus dentatus* wenig empfindlich. Schließlich nahm die Vulnerabilität des Vorderhirns nach dem siebten Lebenstag rasch wieder ab und war ab dem 21. Lebenstag nicht mehr nachweisbar.

In folgenden Versuchen mit embryonalen Ratten wurde gezeigt, dass schon am 19. Embryonaltag der Hypothalamus und andere Areale des Diencephalons apoptotische Neurodegeneration nach Behandlung des schwangeren Muttertieres mit (+)MK801 durchliefen. Auch hier waren die kortikalen Strukturen frei von Apoptose (71).

4.3 Bestimmende Faktoren der Apoptoseinduktion durch (+)MK801

4.3.1 Spezifität der NMDA-Antagonisten

In anderen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass Apoptose durch die Blockade von NMDA-Rezeptoren induziert werden kann. Verschiedene Agenzien, die die NMDA-Rezeptoren durch unterschiedliche Mechanismen hemmen, triggerten eine apoptotische Antwort der Neuronen (70). Dieser Effekt ist NMDA-Rezeptor-spezifisch, da er nicht durch Hemmung anderer exzitatorischer Systeme im Gehirn ausgelöst

werden konnte. In dieser Arbeit zeigte der AMPA-Rezeptoren-Blocker GYKI 52466 keinen Apoptose induzierenden Effekt. Aber auch die Hemmung dopaminerger oder muskarinischer Acetylcholinrezeptoren zeigte keinen Einfluss auf die Apoptoserate bei Versuchstieren (71, 72).

4.3.2 Proapoptotische Wirkung von GABA_A-Agonisten

Eine Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren durch Agonisten wie Benzodiazepine und Barbiturate können eine ähnliche proapoptotische Wirkung beim unreifen Gehirn entfalten wie NMDA-Rezeptorantagonisten (73). Dies kann mit der entwicklungsbedingten Interaktion von GABA_A- und NMDA-Rezeptoren zusammenhängen, da in der frühen Entwicklung des Gehirns Agonisten an GABA_A-Rezeptoren exzitatorisch wirken und die Mg²⁺-Blockade des NMDA-Rezeptorkanals auflösen. Erst im Alter von etwa einer Woche wirkt der GABA_A-Rezeptor inhibitorisch und die proexzitatorische Funktion wird vom AMPA-Rezeptor übernommen (48).

4.3.3 Pharmakologische Eigenschaften von (+)MK801

Das Maximum der proapoptotischen Wirkung von (+)MK801 tritt nach 24 Stunden ein und ist von einem ausreichend hohen Wirkspiegel abhängig. Die Schwellendosis von (+)MK801, die notwendig ist um eine Apoptose zu induzieren, liegt bei 0,25 mg/kg Körpergewicht. Eine erhöhte Apoptoserate wurde bei den Jungratten 4 Stunden nach einer einzigen (+)MK801-Gabe (0,5 mg/kg KG) beobachtet. Eine Hemmung der NMDA-Rezeptoren für etwa 4 Stunden ist ausreichend, um eine apoptotische Neurodegeneration im sich entwickelnden Gehirn von Ratten zu triggern. Eine kürzere Blockierungszeit des NMDA-Rezeptors erwies sich als unwirksam (71). Die Halbwertszeit von (+)MK801 liegt bei 1,9 Stunden. Dies passt gut zu der klinischen Beobachtung, dass die Tiere für etwa vier Stunden nach Medikamentengabe sediert wirkten (74).

4.3.4 Verteilungsmuster der Apoptose und der NMDA-Rezeptorsubtypen

Die Hirnregionen, die sensibel für NMDA-induzierte Apoptose sind, haben viele NMDA-Rezeptor-haltige Neuronen (30, 75). Doch die Rezeptorendichte ist nicht einzig

bestimmend für die neuronale Vulnerabilität. Neuronen der CA1-Hippocampusregion exprimieren besonders viel mRNA für die NR1-Rezeptor-Untereinheit am 7. postnatalen Tag (30), sind aber in diesem Alter wenig empfindlich auf die proapoptotische Wirkung von NMDA-Antagonisten verglichen mit den kortikalen Neuronen der Lamina II. Gleichzeitig sind CA1-Neuronen am 21. Embryonaltag und direkt postnatal vulnerabler gegenüber NMDA-Antagonisten als kortikale Neuronen. Dies legt nahe, dass zusätzliche Faktoren die Vulnerabilität bestimmen, wie z.B. die Zusammenstellung der Untereinheiten der NMDA-Rezeptoren. Dennoch kann auch die Anwesenheit einer bestimmten Rezeptoruntereinheit das Phänomen der Verteilungsmuster nicht hinreichend erklären. So ist in der embryonalen und frühen postnatalen Entwicklungsphase die Apoptose auf das Diencephalon beschränkt. Die ausgeprägte Expression des NR2D/ ϵ 4-Subtyps in dieser Entwicklungsphase könnte hierfür verantwortlich sein. Doch die Expression von ϵ 4 wird innerhalb der ersten zwei postnatalen Wochen insgesamt stark vermindert und taucht z.B. im Cortex überhaupt nicht auf (30, 75, 76). Ebenso wenig können die Expressionsmuster der anderen bekannten Subtypen des Rezeptors eine eindeutige Erklärung der apoptotischen Verteilungsmuster bieten. Vermutlich spielt neben der Zusammensetzung der Rezeptoren die Interaktion mit anderen exzitatorischen sowie inhibitorischen Neurotransmittersystemen eine Rolle.

4.4 Neurotoxizität von NMDA-Antagonisten bei erwachsenen Tieren

Im Prosencephalon der Ratte induzierten NMDA-Antagonisten besonders ausgeprägt am 7. Lebenstag einen apoptotischen Zelluntergang, in einem Alter, in dem das Gehirn die größte Vulnerabilität gegenüber dem exzitotoxischen Effekt von NMDA aufweist. Das Überleben der NMDA-rezeptorentragenden Neuronen hängt in dieser Periode von einem in engen Grenzen gehaltenen glutamatergen Input ab.

Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass bei erwachsenen Ratten NMDA-Antagonisten paradoxerweise exzitotoxische Veränderungen in kortikalen Neuronen auslösen können (77). Niedrig dosiertes (+)MK801 oder PCP triggerte reversible pathologische Veränderungen. Hohe Dosierungen dieser NMDA-Antagonisten jedoch verursachten eine irreversible neuronale Degeneration in verschiedenen Hirnarealen (78, 79, 80, 81). Eine gleichzeitige Gabe von GABA_A-Rezeptor-Agonisten wie Benzodiazepinen und Barbituraten konnte diesen neurotoxischen Effekt hemmen (82).

So zeigten bekannte an GABA_A-Rezeptoren agierende Anästhetika wie Halothan, Isofluran und Propofol eine neuroprotektive Wirkung. Cholinerge, non-NMDA- und σ -Rezeptor-Antagonisten sowie α_2 -adrenerge und 5HT_{2A}-serotoninerge Agonisten konnten ebenfalls die neurotoxische Wirkung von NMDA-Antagonisten im erwachsenen Gehirn hemmen (83, 84, 85, 86, 87).

Durch Messungen von Neurotransmitterkonzentrationen im Gehirn konnte gezeigt werden, dass die systemische Gabe von NMDA-Antagonisten im erwachsenen Hirn eine Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Acetylcholin im Kortex auslöst (88, 89). Die exzitotoxische Wirkung von NMDA-Rezeptor-Antagonisten ist bei erwachsenen Tieren daher vermutlich indirekt und entsteht durch die Blockade von NMDA-Rezeptoren auf kortikalen inhibitorischen Neuronen (GABAerge und noradrenerge). Glutamat kontrolliert hier über die tonische Aktivierung der inhibitorischen Neuronen den Aktivitätszustand exzitatorischer Bahnen. Die NMDA-Rezeptor-Blockade enthemmt somit diese exzitatorischen Bahnen und kortikale Neuronen werden dann exzessiv stimuliert.

Das unreife Gehirn der Jungratten ist gegenüber diesem indirekten exzitotoxischen Mechanismus unempfindlich. Farber zeigte, dass erst ab einem Lebensalter von 45 Tagen vergleichbare Veränderungen kortikaler Neuronen zu finden sind (90). Dieses exzitotoxische Phänomen unterscheidet sich fundamental vom Effekt der NMDA-Antagonisten auf das infantile Gehirn. Zugleich ist das Auslösen einer Apoptose durch NMDA-Antagonisten nur im unreifen Gehirn möglich und nicht im adulten.

4.5 Mechanismen der Apoptoseinduktion

4.5.1 Intrazellulärer Kalziumspiegel

NMDA-Rezeptorkanäle sind hochpermeabel für Kalzium. Wird der Rezeptor aktiviert, kommt es zu einem Einstrom von Ca²⁺-Ionen und somit zu einer erhöhten Ca²⁺-Konzentration in der Zelle. Eine Blockade des Rezeptors führt konsekutiv zu niedrigeren intrazellulären Ca²⁺-Spiegeln (23). Hohe Ca²⁺-Spiegel sind notwendig, um z.B. Caspasen zu aktivieren, und es ist schon länger bekannt, dass hohe intrazelluläre Kalziumspiegel einen aktiven Zelltod auslösen können (91). Inzwischen konnte aber gezeigt werden, dass auch niedrige intrazelluläre Kalziumspiegel zu Apoptose führen

(92); eine Blockade spannungsabhängiger Kalziumkanäle, z.B. durch Nifedipin oder Nimodipin, löst jedoch trotz niedriger Ca^{2+} -Spiegel keine Apoptose aus (72). Von Bedeutung könnten hier die intrazellulären Oszillationen der Kalziumkonzentrationen sein, die sich im sich entwickelnden Gehirn in ihrer Art vom adulten Hirn unterscheiden. Die zwei Formen der Kalziumoszillationen – Spitzen und Wellen (*spikes* und *waves*) – haben unterschiedliche Auswirkungen auf neuronale Funktionen. So sorgen Wellen im gesamten Leben der Säugetiere für das Aussprossen und Wachsen von Axonen, während die Spitzen für die Differenzierung von Neuronen zuständig sind (46, 47). Da Glutamat-Rezeptorkanäle Kalzium-Spitzen und spannungsabhängige Kanäle Kalzium-Wellen auslösen, ist denkbar, dass die Ca^{2+} -Spitzen, nicht aber die -Wellen, für das Überleben unreifer Neuronen notwendig sind.

4.5.2 Molekulare Mechanismen der Apoptoseinduktion

Neben diesen neurophysiologischen Erkenntnissen sind in den letzten Jahren die intrazellulären molekularen Mechanismen der NMDA-induzierten Neuroprotektion ins Zentrum des Forschungsinteresses gerückt. Diskutiert werden zur Signaltransduktion des NMDA-Rezeptors unter anderem zwei Mechanismen: die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Kinasen (CaMK) und die *mitogen activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases* (MAPK/ERK, eine große Familie von Prolin-gesteuerten Serin/Threonin-Kinasen) (93, 94, 95, 96).

So fand man in früheren *in vitro* Versuchen, dass in Neuronen, die mit Glutamat oder NMDA stimuliert wurden, ein erhöhter intrazellulärer Kalziumspiegel die Ca^{2+} /Calmodulin-Kinase (CaM-K) und die Ras-ERK1/2-Kaskade aktivierte. Dies führte seinerseits zu einer Phosphorylierung – und damit zur Inaktivierung – des proapoptotischen Proteins BAD (97, 98, 99), was zur erhöhten Überlebensrate der Neuronen führte.

Aber auch die Expression neuer Gene scheint eine Rolle zu spielen, denn die postsynaptische NMDA-Rezeptorstimulation *in vivo* führte zur Transkription von verschiedenen Frühgenen (*immediate early genes*), die unter anderem vom Transkriptionsfaktor *cAMP response element binding protein* (CREB) kontrolliert werden (100, 101, 102, 103). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die NMDA-Rezeptorabhängige intrazelluläre Kalziumerhöhung zur Aktivierung von CREB führt und konsekutiv zur Synthese von BDNF (*brain derived neurotrophic factor*), einem von

CREB regulierten antiapoptotischen Protein, welches neuroprotektiv wirken kann (104). Insbesondere die Rolle des Transkriptionsfaktors CREB wurde intensiv erforscht, da er entscheidenden Einfluss auf die dauerhafte Synapsenplastizität, das Lernen und Gedächtnis und aber auch auf das Überleben von Neuronen hat (105, 106, 107). Mantamadiotis konnte zeigen, dass das ZNS von Mäusen ohne Creb1 (einem Mitglied der CREB-Familie) während der Entwicklung eine starke apoptotische Neurodegeneration erleidet, wenn CREM, ein weiteres Mitglied der CREB-Familie, ebenfalls fehlt (108).

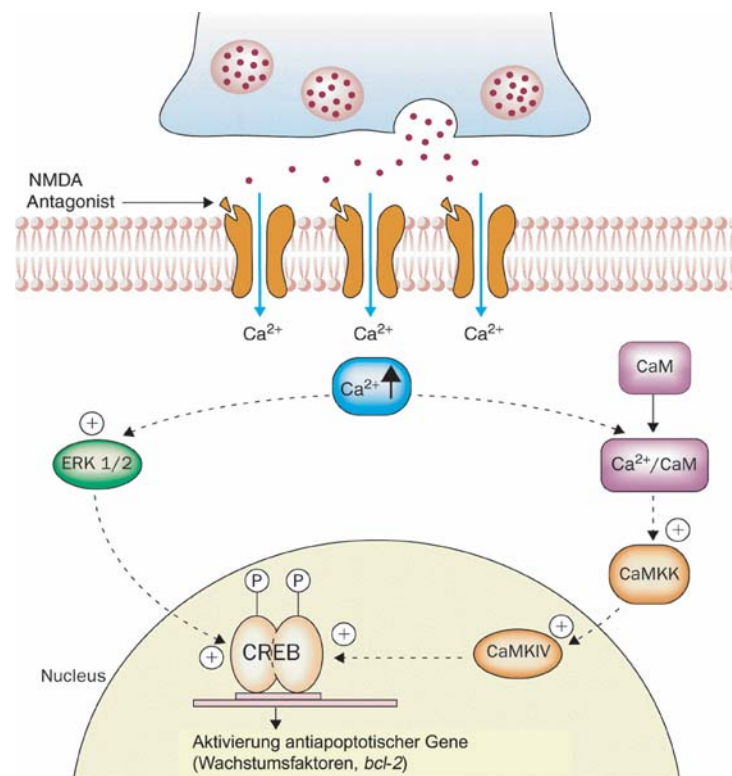


Abbildung 12 Die Aktivierung des NMDA-Rezeptors führt zum Kalziumeintritt in die Zelle und zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Dies führt zur Aktivierung der *extracellular signal regulated kinase* (ERK1/2)-vermittelten Signalübermittlung von der Synapse zum Nucleus, wo das *cAMP response element binding protein* (CREB) phosphoryliert wird. Gleichzeitig bindet Calmodulin (CaM) Calmodulin-Kinase IV (CaMK IV) und die Calmodulin-Kinase-Kinase (CaMKK). Die CaMKK phosphoryliert und aktiviert damit die CaMK IV, die ihrerseits CREB phosphoryliert und aktiviert. Beide Kaskaden führen zur Transkription antiapoptotischer Gene, wie Wachstumsfaktoren und bcl-2 (109).

Nuclear factor κB (NF κB), ein weiterer Transkriptionsfaktor, spielt eine Rolle in der neuronalen Plastizität und bei der antiapoptotischen Wirkung nach NMDA-Rezeptorstimulation (110). Er wird unter anderem durch synaptische Stimulation und durch exogenes NMDA aktiviert (111, 112). Obwohl NF κB auch proapoptotische Wirkungen gezeigt hat (113), gibt es zunehmend Hinweise dafür, dass er auch verschiedene neuroprotektive Mechanismen vermittelt. In Tier- und Zellkulturversuchen

ließ sich in Abwesenheit der p50 Untereinheit des NF κ B eine vermehrte exzitotoxische Neurotoxizität nachweisen (114). NMDA-rezeptorinduzierte Neuroprotektion in cerebellären Körnerzellkulturen führte ebenfalls zur Aktivierung von NF κ B, welches seinerseits die Produktion des *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) anregte (112).

4.5.3 Neuronale Wachstumsfaktoren

Als weiterer Mechanismus der Apoptoseinduktion ist ein Mangel an neuronalen Wachstumsfaktoren denkbar. Eine Blockade neuronaler exzitatorischer Rezeptoren führt zu einer Signaldeprivation in den synaptisch mit dem Neuron verbundenen Zielzellen und zu einer verminderten Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (NGF, IGF, BDNF, NT-3), was wiederum zu apoptotischem Zelluntergang des Effektorneurons führt (115, 116, 117). Manche dieser Wachstumsfaktoren wirken neuroprotektiv durch die Aktivierung von CREB. So kommt es bei sympathischen Nervenzellen, die mittels NGF-Stimulation überleben, zur CREB-abhängigen Aktivierung des antiapoptotischen Gens *bcl-2* (118). Die neuroprotektive Wirkung von BDNF auf Körnerzellen scheint ebenfalls zum Teil auf CREB-abhängigen Transkriptionsmechanismen zu basieren (99). Interessanterweise wird die Expression des BDNF auch durch CREB gesteuert (119, 120). Somit wäre sogar denkbar, dass die Aktivierung von CREB eine sich selbst verstärkende Signalkette auslöst, die vor Apoptose schützt.

4.6 Bedeutung der Ergebnisse im klinischen Zusammenhang

Im menschlichen fetalen Vorderhirn liegt das Maximum der NMDA-Rezeptor-Expression zwischen der 20. und 22. Schwangerschaftswoche (121), einer Periode, die den Beginn des Hirnwachstumsspurts markiert, welcher einen großen Teil des dritten Trimesters umfasst und weit in die postnatale Periode hineinreicht (122). Bei Ratten findet die höchste Expressionsrate von NR1 und die Wachstumsbeschleunigung des Hirns in der ersten Woche nach der Geburt statt (76). Wenn die maximale Vulnerabilität des menschlichen Vorderhirns gegenüber der proapoptotischen Wirkung von NMDA-Antagonisten den entwicklungsbedingten Ereignissen bei der Ratte entspricht, würde das Fenster der Vulnerabilität das gesamte letzte Trimester der Schwangerschaft einschließen. Somit sind insbesondere die medizinischen Fachdisziplinen Geburtshilfe

und Neonatologie sensible Bereiche, in welchen die potentiell neurotoxische Substanz iatrogen verabreicht werden könnte.

4.6.1 NMDA-Antagonisten in der pädiatrischen Anästhesie

In der pädiatrischen Anästhesie werden Ketamin und Stickstoffmonoxid (Lachgas), zwei potente NMDA-Antagonisten, in therapeutisch relevanten Dosierungen verabreicht (123, 124, 125). Zur intravenösen Narkose wird Ketamin in Dosen zwischen 0,5 und 10 mg/kg KG verwendet.

Lachgas oder Stickstoffmonoxid (NO) hat ähnliche Eigenschaften wie das Ketamin, es blockiert NMDA-Rezeptoren und kann zu weitreichender apoptotischer Neurodegeneration im unreifen Rattengehirn führen (125). Eine länger dauernde Narkose mit NO oder Ketamin im frühen Kindesalter ist also potentiell neurotoxisch. Hierbei ist die Dauer der NMDA-Blockade zu bedenken, die notwendig ist, um den neurotoxischen Prozess wirksam werden zu lassen. Wie bereits beschrieben, ist bei Ratten eine Mindesthemmzeit der Rezeptoren von 4 Stunden notwendig, um Apoptose zu induzieren. Bislang liegen nur unzureichende Untersuchungen zur schädigenden Wirkung dieser beiden NMDA-Antagonisten auf das frühkindliche menschliche Gehirn vor. Allerdings scheint NO das Auftreten von intraventrikulären Blutungen und periventrikulärer Leukomalazie bei Frühgeborenen zu erhöhen (126, 127, 128).

4.6.2 Drogenmissbrauch werdender Mütter

Wichtig erscheint im Hinblick auf die Dauer der Rezeptorenhemmung der Drogenmissbrauch durch werdende Mütter. Der NMDA-Antagonist Phencyclidin (PCP = **P**henyl-**C**yclohexyl-**P**iperidin) – in der Drogenszene auch unter dem Namen *angel dust* bekannt – ist zwar nicht mehr so populär, stellt aber immer noch eine Gefahrenquelle für das ungeborene Kind dar. Es wurde zunächst als Kurznarkotikum und Analgetikum (Sernyl®) gebraucht, wegen halluzinogener Wirkung später aber aus dem Verkehr gezogen. Die halluzinogene Wirkung wurde durch orale oder inhalative Verwendung ausgenutzt (129). Weiterhin verfügbar ist Ketamin ("*Special K*"), welches ebenfalls wegen seiner halluzinogenen Wirkung missbraucht wird.

Die am weitesten verbreitete Droge Ethanol ist ebenfalls ein potenter NMDA-Antagonist, wie Versuche von Lovinger und Hoffmann zeigten (130, 131, 132, 133).

Sein schädlicher Einfluss auf das unreife menschliche Gehirn wurde in den 70er Jahren entdeckt (134, 135). Zwei Syndrome, die durch Alkoholmissbrauch während der Schwangerschaft verursacht werden können, wurden beschrieben: das fetale Alkoholsyndrom (FAS) und die fetalen Alkoholeffekte (FAE). Im Rahmen des FAS werden Herzfehler, kraniofaziale Anomalien, Deformitäten der Extremitäten, Mikrozephalie und schwere neurologische Defizite beobachtet. Kinder, die unter dem FAE leiden, zeigen geringer ausgeprägte Symptome mit neurologischen Auffälligkeiten, Lernbehinderungen, verminderter Intelligenz, Hyperaktivität sowie Depression und Psychosen im Erwachsenenalter. Es wurde nachgewiesen, dass Ethanol in der vulnerablen Phase der Entwicklung von Ratten in ähnlicher Weise wie (+)MK801 Apoptose auslösen kann. Die durch Ethanol ausgelöste Neurodegeneration ist jedoch viel ausgedehnter als jene, die durch andere NMDA-Antagonisten verursacht wird. Das hängt vermutlich mit der Tatsache zusammen, dass Ethanol gleichzeitig am GABA_A-Rezeptor agonistisch wirkt und seine neurotoxische Potenz dadurch verstärkt wird (73).

4.6.3 Neurodegenerative Erkrankungen und NMDA-Rezeptoren

Exzitotoxische Mechanismen wurden als Basis der Neurodegeneration im Rahmen vieler akuter und chronischer neurodegenerativer Erkrankungen angesehen. Störungen im intrazellulären Energiestoffwechsel sollen bei chronisch neurodegenerativen Erkrankungen die Empfindlichkeit der Neuronen gegenüber Glutamat verstärken. So können schon physiologische Glutamatkonzentrationen eine Neurodegeneration hervorrufen. Ein gestörter Energiestoffwechsel wurde bei der Friedreich'schen Ataxie (136), der amyotrophen Lateralsklerose (137, 138), der Chorea Huntington und dem Morbus Parkinson (139) gefunden.

Akute neurodegenerative Erkrankungen wurden unter anderem in Tiermodellen der Hirnischämie und des Hirntraumas untersucht und bei erwachsenen Tieren konnte in diesen Fällen mit NMDA-Antagonisten neuroprotektive Effekte erzielt werden (52, 53, 140, 141). In klinischen Studien mit erwachsenen Patienten konnte eine Wirksamkeit der Behandlung mit NMDA-Inhibitoren nach einem Schlaganfall oder Hirntrauma allerdings nicht nachgewiesen werden, denn aufgrund von vielen Nebenwirkungen mussten die Studien abgebrochen werden (142, 143).

In Anbetracht der Tatsache, dass NMDA-Antagonisten eine apoptotische Neurodegeneration bei jungen Tieren und exzitotoxische Schäden bei erwachsenen

Tieren auslösen können, ist die Behandlung von Hirntraumata und Hirninfarkten mit NMDA-Antagonisten fragwürdig. Insbesondere der ursprünglich angedachte Einsatz von solchen Medikamenten nach einem Schädel-Hirn-Trauma zur Neuroprotektion bei jungen Patienten scheint ungeeignet, ja sogar schädlich, da sie den Untergang von Nervenzellen noch potenzieren könnten (55).

4.7 Schluss

So wichtig die tierexperimentelle Forschung in der Untersuchung des schädigenden Einflusses von NMDA-Antagonisten ist, ist letztendlich die Wirkung der NMDA-Rezeptorhemmung auf Kinder während der Hirnentwicklung von belang. Bisher kann als gesichert gelten, dass Alkohol als potenter NMDA-Antagonist und GABA_A-Agonist frühkindliche Schäden mit gravierenden Spätfolgen verursachen kann. Untersuchungen zu den in der Anästhesie gebräuchlichen NMDA-Inhibitoren Ketamin oder Stickstoffmonoxid oder anderer Anästhetika fehlen bislang. Die Indikation eines medizinischen Gebrauchs dieser Medikamente in der Pädiatrie sollte sehr eng gestellt werden. Dasselbe sollte auch im Gebrauch von GABA-ergen Antiepileptika gelten, die in der Pädiatrie häufig und über längere Zeiträume verabreicht werden. Diese wirken – wenn auch in geringerem Maße als NMDA-Antagonisten – ebenfalls proapoptotisch (144). Aufgrund fehlender Therapiealternativen kann dies bei der Behandlung von epileptischen Müttern im letzten Trimenon der Schwangerschaft oder von Neugeborenenkrämpfen nur bedingt gesagt werden. Es bleibt also die Suche nach Medikamenten, die trotz effektiver antikonvulsiver Wirkung die Hirnentwicklung nicht durch apoptotische Neurodegeneration beeinträchtigen oder nach Adjuvantien, die die proapoptotische Wirkung dieser Antikonvulsiva hemmen können.

5. Zusammenfassung

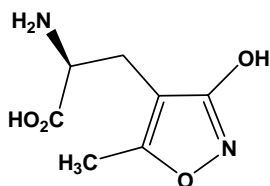
Während der normalen Entwicklung des zentralen Nervensystems kommt programmierter Zelltod oder Apoptose vor, was der Eliminierung ineffizienter Neuronen dient. Spezifische exzitatorische Glutamaterezeptoren scheinen hierbei eine wichtige Rolle zu spielen. Werden in der frühen Neonatalperiode die glutamatergen N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren für wenige Stunden gehemmt, so kommt es im sich entwickelnden Rattengehirn zu ausgedehnten apoptotischen Zelluntergängen. Dieser Effekt lässt sich bereits direkt postpartal beobachten, ist am stärksten bei sieben Tagen alten Ratten ausgeprägt (wo es zu einer Potenzierung bis zur 39-fachen Apoptoserate kommt) und nimmt bis zum 30. Lebenstag wieder ab. Neuronale Apoptose ist erstmals nach einer 4-stündigen Hemmung der Rezeptoren zu beobachten und zeigt nach 24-stündiger Inhibition ihre maximale Ausdehnung. Der Neurotransmitter Glutamat, der als physiologischer Agonist an NMDA-Rezeptoren wirkt, scheint somit das Überleben von Neuronen während der Entwicklung des Gehirns zu beeinflussen und Nervenzellen, die zu wenig glutamaterge Reize erhalten, unterliegen dem programmierten Zelltod. Dieser Effekt kann über nonNMDA-Rezeptoren (AMPA- oder Kainat-Rezeptoren) nicht ausgelöst werden, was für die Spezifität des NMDA-Rezeptors spricht und seine Rolle in der Hirnentwicklung hervorhebt.

In der pädiatrischen Anästhesie werden unter anderem die NMDA-Antagonisten Ketamin und Stickstoffmonoxid (NO) verwendet, die in Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit bei entsprechend langer Anwendung als bedenklich erscheinen. Drogenmissbrauch schwangerer Frauen stellt in diesem Zusammenhang eine weitere große Gefahrenquelle für das ungeborene Kind dar. Die wegen ihrer halluzinogenen Wirkung eingenommenen NMDA-Antagonisten Ketamin und Phencyclidin (PCP, ein altes Kurzzeitanästhetikum), können cerebrale Neuronen des Feten schädigen. Bei längerem Missbrauch kann davon ausgegangen werden, dass die NMDA-Rezeptoren des ungeborenen Feten lange genug gehemmt werden um apoptotische Schäden im Gehirn auszulösen. Am weitesten verbreitet mit großem Schädigungspotential ist jedoch der Ethanol. Er hat ebenfalls antagonistische Eigenschaften am NMDA-Rezeptor, und die durch ihn verursachte Nervenzellschädigung wird durch den agonistischen Effekt an GABA_A-Rezeptoren sogar noch verstärkt. Die fetale Alkohol-embryopathie und die fetalen Alkoholeffekte können durch diesen Mechanismus teilweise erklärt werden.

6. Glossar

7CK 7-Chloroquinurenat, NMDA-Antagonist

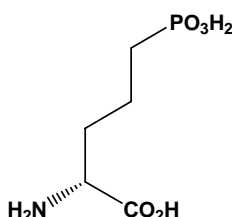
AMPA



α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure

APAF 1 *Apoptotic protease activating factor 1*

APV



2-Amino-5-Phosphovalerat, NMDA-Antagonist

ATP Adenosintriphosphat

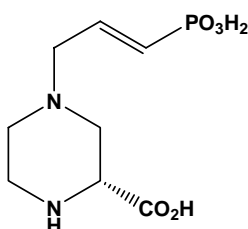
Bcl-2 Proteinfamilie mit anti- und proapoptotischen Mitgliedern, Bcl steht für *burkitt cell lymphoma*

BDNF *Brain derived neurotrophic factor*, neuronaler Wachstumsfaktor

CaMK Calmodulinkinase

CNQX 6-Cyano-7-nitrochinoxalin-2,3-dion, non-NMDA-Antagonist

CPP



3-(2-Carboxypiperazin-4-yl)-propyl-1-phosphonsäure

CREB *cAMP response element binding protein*, Transkriptionsfaktor

D-AP 5 D-2-Amino-5-phosphopentansäure, NMDA-Antagonist

ERK *Extracellular signal-regulated kinases*, Serin/Threonin-Kinase

FAE / FAS Fetale Alkoholeffekte, fetales Alkoholsyndrom

Fas Zelltodrezeptor, Synonym: CD 95

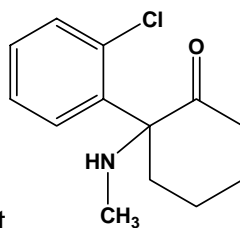
GABA γ -Aminobuttersäure

GYKI 52466 1-(4-Aminophenyl)-4-methyl-7,8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepin

i.p. intraperitoneal

IGF *Insulin like growth factor*, Wachstumsfaktor

Ketamin



NMDA-Antagonist

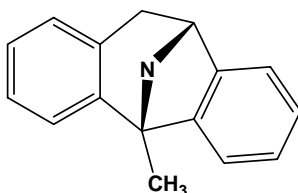
MAPK

Mitogen activated protein kinases, Serin/Threonin-Kinase

mGLU-R

Metabotroper Glutamatrezeptor

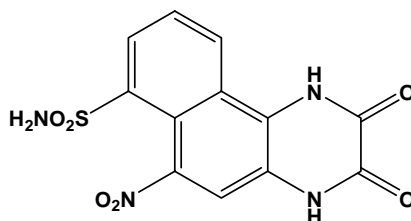
(+)MK-801



Dizocilpin, (+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a, d]cyclohepten-5,10-imin-hydrogen-maleat, NMDA-Rezeptorantagonist
messenger-RNA

mRNA

NBQX



2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulphamoyl-benzo(f)-chinoxalin, non-NMDA-Rezeptorantagonist.

NGF

Nerve growth factor

NMDA

N-Methyl-D-aspartat

NO

Stickstoffmonoxid, Lachgas

NR 1

NMDA Rezeptoruntereinheit 1

NT-3

Neurotrophin 3, neuronaler Wachstumsfaktor

PCP

Phenzyklidin

PSD

Postsynaptic density, Proteinkonglomerat in der postsynaptischen Membran, bestehend aus über 30 Proteinen

s.c.

subkutan

SEM

Standard error of mean = Standardfehler des MittelwertsTNF α Tumornekrosefaktor α

TUNEL

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling

7. Lebenslauf und Publikation

Geburtsdaten: geboren am 24.12.1969 in Leonberg

Schulbildung

1976-1980	Buckenberg-Grundschule, Pforzheim
1980-1986	Konrad-Adenauer-Realschule, Pforzheim
1986-1989	Technisches Gymnasium Heinrich Wieland, Pforzheim
04/1989	Abitur

Berufsausbildung

10/1991-03/1992	Studium des Chemieingenieurwesens an der Universität Karlsruhe
04/1992-03/1996	Studium der Medizin an der Philipps-Universität Marburg/Lahn
04/1996-03/1998	Medizinstudium an der Freien Universität Berlin

Famulaturen

09/1994	Orthopädie an der Klinik der Karls-Universität in Prag
02-03/1996	Pädiatrie in der Gemeinschaftspraxis Kegel & Vortisch in Berlin
08-10/1996	Infektionskrankheiten und Tropenmedizin an der Universitätsklinik Prof. Edgard Santos in Salvador da Bahia, Brasilien

Praktisches Jahr

04/1998-08/1998	Innere-Tertial im Auguste-Viktoria-Krankenhaus (HIV-Station), Berlin
08/1998-12/1998	Pädiatrie-Tertial im Mayo General Hospital Castlebar, Irland
12/1998-03/1999	Chirurgie-Tertial im Auguste-Viktoria-Krankenhaus, Berlin
03/1999	Hospitalation in der Kinderchirurgie im Virchow-Klinikum, Berlin

Arzt im Praktikum

08/1999-01/2001	Universitätskinderklinik Essen in den Abteilungen Kinderkardiologie, Allgemeinpädiatrie mit den Schwerpunkten Endokrinologie und Neurologie, Infektionsstation mit dem Schwerpunkt zystische Fibrose
-----------------	--

Arzt in Weiterbildung

07/2001-09/2002	St. Clemens Hospitale Oberhausen in der Allgemeinpädiatrie mit ausgelasteter Notfallambulanz und Neonatologie
-----------------	---

Forschungstätigkeiten

- 11/2002-6/2003 Pädiatrische Immunologie: Aktivierung von CD4- und CD8-T-Lymphozyten und Veränderung des T-Zell-Rezeptorrepertoires von HIV-positiven Kindern mittels Durchflusszytometrie und Multiplex-PCR, North Shore University Hospital Manhasset, NY, U.S.A.
- Seit 7/2003 Sepsis/septischer Schock: Molekulare Mechanismen der antiinflammatorischen Wirkung des Vasopeptids Adrenomedullin (AM) und seines Bindeproteins (AMBP-1) in Makrophagen und vaskulären Endothelzellen. North Shore University Hospital Manhasset, NY, U.S.A.

Fortbildungen

- 11/1999 Kinder-EKG-Kurs - Uniklinikum Essen, Prof. Schmaltz
 10/2000 Interdisziplinäre Pneumologie - Ruhrlandklinik, Prof. Konietztko
 2/2001 Strahlenschutzkurs - Einführung, Euskirchen, Dr.Helmke
 6/2001 Kinder-Sonographie-Kurs - Nordseeklinik Borkum, Prof. Lengerke

Publikation

- Titel: Blockade of NMDA Receptors and Apoptotic Neurodegeneration in the Developing Brain
 Autoren: C. Ikonomidou, F. Bosch, M. Miksa
 in: Science (283), S.70, 1. Januar 1999

8. Literaturverzeichnis

- 1 Dobbing, J. (1974): The later growth of the brain and its vulnerability, Pediatrics 53 [1], Seite 2-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4588131
- 2 Wyllie, A. H.; Kerr, J. F. und Currie, A. R. (1980): Cell death: the significance of apoptosis, Int Rev Cytol 68, Seite 251-306. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7014501
- 3 Ishimaru, M. J.; Ikonomidou, C.; Tenkova, T. I.; Der, T. C.; Dikranian, K.; Sesma, M. A. und Olney, J. W. (1999): Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain, J Comp Neurol 408 [4], Seite 461-76. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10340498
- 4 Ishimaru, M.; Ikonomidou, C.; Dikranian, K. und Olney, J. W. (1997), Soc. Neurosci. Abstr. 23, Seite 895.
- 5 Krammer, P.H. (2000): Apoptose, Deutsches Ärzteblatt 97, Seite C1315-C1322.
- 6 Raff, M. C. (1992): Social controls on cell survival and cell death, Nature 356 [6368], Seite 397-400. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1557121
- 7 Blom, W.M. (2000): Cell death in rat hepatocytes: Apoptosis-inducing and -protective mechanisms, Cytologie, celbiologie en elfysiologie, Division of Toxicology, Leiden-Amsterdam Center for Drug-Research (LACDR), Universiteit Leiden, Leiden, Niederlande.
- 8 Kerr, J. F.; Wyllie, A. H. und Currie, A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, Br J Cancer 26 [4], Seite 239-57. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4561027
- 9 Vaux, D. L. und Korsmeyer, S. J. (1999): Cell death in development, Cell 96 [2], Seite 245-54. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9988219
- 10 Petit, P. X.; Zamzami, N.; Vayssiere, J. L.; Mignotte, B.; Kroemer, G. und Castedo, M. (1997): Implication of mitochondria in apoptosis, Mol Cell Biochem 174 [1-2], Seite 185-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9309685

- 11 Kantrow, S. P. und Piantadosi, C. A. (1997): Release of cytochrome c from liver mitochondria during permeability transition, *Biochem Biophys Res Commun* 232 [3], Seite 669-71. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9126333
- 12 Zamzami, N.; Susin, S. A.; Marchetti, P.; Hirsch, T.; Gomez-Monterrey, I.; Castedo, M. und Kroemer, G. (1996): Mitochondrial control of nuclear apoptosis, *J Exp Med* 183 [4], Seite 1533-44. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8666911
- 13 Susin, S. A.; Zamzami, N.; Castedo, M.; Hirsch, T.; Marchetti, P.; Macho, A.; Daugas, E.; Geuskens, M. und Kroemer, G. (1996): Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease, *J Exp Med* 184 [4], Seite 1331-41. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8879205
- 14 Toescu, E. C. (1998): Apoptosis and cell death in neuronal cells: where does Ca²⁺ fit in?, *Cell Calcium* 24 [5-6], Seite 387-403. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10091008 und Webseite der Uni Birmingham:
<http://medweb.bham.ac.uk/research/toescu/Teaching/NDegen/Apoptosis.html>
- 15 Jacobson, M. D.; Weil, M. und Raff, M. C. (1997): Programmed cell death in animal development, *Cell* 88 [3], Seite 347-54. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9039261
- 16 Boustany, Rose-Mary und Hannun, Yusuf A. (1999): Concepts and Methods, Apoptosis in Neurobiology Seite 3-4, CRC Press, Boca Raton.
- 17 Lerner, T. (1995): Isolation of a novel gene underlying Batten disease, CLN3. The International Batten Disease Consortium, *Cell* 82 [6], Seite 949-57. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7553855
- 18 Barinaga, M. (1998): Is apoptosis key in Alzheimer's disease?, *Science* 281 [5381], Seite 1303-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9735049
- 19 Watkins, J. C. und Evans, R. H. (1981): Excitatory amino acid transmitters, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21, Seite 165-204. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6112965
- 20 Pin, J. P. und Duvoisin, R. (1995): The metabotropic glutamate receptors: structure and functions, *Neuropharmacology* 34 [1], Seite 1-26. URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7623957

- 21 Dingleline, Raymond und McBain, Chris J. (1999): II.)15. Three Classes of Ionotropic Glutamate Receptor, Siegel, George J.; Agranoff, Bernard W.; Albers, R. Wayne; Fisher, Stephen K. und Uhler, Michael D., Basic neurochemistry : molecular, cellular, and medical aspects, 6th. Auflage, Seite xxi, 1183, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- 22 Johnson, J. W. und Ascher, P. (1987): Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons, Nature 325 [6104], Seite 529-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2433595
- 23 Mori, H. und Mishina, M. (1995): Structure and function of the NMDA receptor channel, Neuropharmacology 34 [10], Seite 1219-37. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8570021
- 24 Ishii, T.; Moriyoshi, K.; Sugihara, H.; Sakurada, K.; Kadotani, H.; Yokoi, M.; Akazawa, C.; Shigemoto, R.; Mizuno, N.; Masu, M. und et al. (1993): Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits, J Biol Chem 268 [4], Seite 2836-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8428958
- 25 Das, S.; Sasaki, Y. F.; Rothe, T.; Premkumar, L. S.; Takasu, M.; Crandall, J. E.; Dikkes, P.; Conner, D. A.; Rayudu, P. V.; Cheung, W.; Chen, H. S.; Lipton, S. A. und Nakanishi, N. (1998): Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A, Nature 393 [6683], Seite 377-81. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9620802
- 26 Kato, N. und Yoshimura, H. (1993): Reduced Mg²⁺ block of N-methyl-D-aspartate receptor-mediated synaptic potentials in developing visual cortex, Proc Natl Acad Sci U S A 90 [15], Seite 7114-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8394010
- 27 Tingley, W. G.; Roche, K. W.; Thompson, A. K. und Huganir, R. L. (1993): Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain, Nature 364 [6432], Seite 70-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8316301
- 28 Moriyoshi, K.; Masu, M.; Ishii, T.; Shigemoto, R.; Mizuno, N. und Nakanishi, S. (1991): Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor, Nature 354 [6348], Seite 31-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1834949

- 29 Ikeda, H.; Dawes, E. und Hankins, M. (1992): Spontaneous firing level distinguishes the effects of NMDA and non-NMDA receptor antagonists on the ganglion cells in the cat retina, *Eur J Pharmacol* 210 [1], Seite 53-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1350987
- 30 Akazawa, C.; Shigemoto, R.; Bessho, Y.; Nakanishi, S. und Mizuno, N. (1994): Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats, *J Comp Neurol* 347 [1], Seite 150-60. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7798379
- 31 It'o, Masao (1984): *Granule Cells, The Cerebellum and Neural Control* Seite 74-85, Raven Press, New York.
- 32 Burgoyne, R. D. und Cambray-Deakin, M. A. (1988): The cellular neurobiology of neuronal development: the cerebellar granule cell, *Brain Res* 472 [1], Seite 77-101. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3277691
- 33 Chuang, D. M.; Gao, X. M. und Paul, S. M. (1992): N-methyl-D-aspartate exposure blocks glutamate toxicity in cultured cerebellar granule cells, *Mol Pharmacol* 42 [2], Seite 210-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1355259
- 34 D'Angelo, E.; Rossi, P.; De Filippi, G.; Magistretti, J. und Taglietti, V. (1994): The relationship between synaptogenesis and expression of voltage-dependent currents in cerebellar granule cells in situ, *J Physiol Paris* 88 [3], Seite 197-207. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7530548
- 35 Altman, J. (1982): *The Cerebellum*, New Vistas, Palay, Sanford L. und Chan-Palay, Victoria, *The Cerebellum*, New Vistas Seite 8-49, Springer-Verlag, Berlin ; New York.
- 36 Altman, J. (1972): Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. 3. Maturation of the components of the granular layer, *J Comp Neurol* 145 [4], Seite 465-513. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4114591
- 37 Rakic, P. (1971): Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in Macacus Rhesus, *J Comp Neurol* 141 [3], Seite 283-312. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4101340

- 38 Edmonson, J. C. und Hatten, M. E. (1987): Glial-guided granule neuron migration in vitro: a high-resolution time-lapse video microscopic study, J Neurosci 7 [6], Seite 1928-34. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3598656
- 39 Burgoyne, R. D.; Pearce, I. A. und Cambray-Deakin, M. (1988): N-methyl-D-aspartate raises cytosolic calcium concentration in rat cerebellar granule cells in culture, Neurosci Lett 91 [1], Seite 47-52. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2845308
- 40 Howe, J. R.; Cull-Candy, S. G. und Colquhoun, D. (1991): Currents through single glutamate receptor channels in outside-out patches from rat cerebellar granule cells, J Physiol 432, Seite 143-202. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1715916
- 41 Komuro, H. und Rakic, P. (1993): Modulation of neuronal migration by NMDA receptors, Science 260 [5104], Seite 95-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8096653
- 42 Zhu, X. Z. und Chuang, D. M. (1987): Modulation of calcium uptake and D-aspartate release by GABAB receptors in cultured cerebellar granule cells, Eur J Pharmacol 141 [3], Seite 401-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2822450
- 43 Laurie, D. J.; Wisden, W. und Seeburg, P. H. (1992): The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development, J Neurosci 12 [11], Seite 4151-72. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1331359
- 44 Ben-Ari, Y.; Khazipov, R.; Leinekugel, X.; Caillard, O. und Gaiarsa, J. L. (1997): GABAA, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated 'menage a trois', Trends Neurosci 20 [11], Seite 523-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9364667
- 45 Obrietan, K. und van den Pol, A. N. (1995): GABA neurotransmission in the hypothalamus: developmental reversal from Ca²⁺ elevating to depressing, J Neurosci 15 [7 Pt 1], Seite 5065-77. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7623135
- 46 Spitzer, N. C.; Olson, E. und Gu, X. (1995): Spontaneous calcium transients regulate neuronal plasticity in developing neurons, J Neurobiol 26 [3], Seite 316-24. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7775965
- 47 Gu, X. und Spitzer, N. C. (1997): Breaking the code: regulation of neuronal differentiation by spontaneous calcium transients, *Dev Neurosci* 19 [1], Seite 33-41. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9078431
 - 48 Lucas, D.R. et al. (1957): The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina, *Arch. Ophtalmol.* 58, Seite 193-201.
 - 49 Olney, J. W. (1969): Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate, *Science* 164 [880], Seite 719-21. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5778021
 - 50 Benveniste, H.; Drejer, J.; Schousboe, A. und Diemer, N. H. (1984): Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis, *J Neurochem* 43 [5], Seite 1369-74. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6149259
 - 51 Ikonomidou, C.; Mosinger, J. L.; Salles, K. S.; Labruyere, J. und Olney, J. W. (1989): Sensitivity of the developing rat brain to hypobaric/ischemic damage parallels sensitivity to N-methyl-aspartate neurotoxicity, *J Neurosci* 9 [8], Seite 2809-18. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2671294
 - 52 Olney, J. W.; Ikonomidou, C.; Mosinger, J. L. und Frierdich, G. (1989): MK-801 prevents hypobaric-ischemic neuronal degeneration in infant rat brain, *J Neurosci* 9 [5], Seite 1701-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2656934
 - 53 McDonald, J. W.; Silverstein, F. S. und Johnston, M. V. (1987): MK-801 protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic damage, *Eur J Pharmacol* 140 [3], Seite 359-61. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2820765
 - 54 Yan, G. M.; Ni, B.; Weller, M.; Wood, K. A. und Paul, S. M. (1994): Depolarization or glutamate receptor activation blocks apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons, *Brain Res* 656 [1], Seite 43-51. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7804844
 - 55 Pohl, D.; Bittigau, P.; Ishimaru, M. J.; Stadthaus, D.; Hubner, C.; Olney, J. W.; Turski, L. und Ikonomidou, C. (1999): N-Methyl-D-aspartate antagonists and

- apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain, Proc Natl Acad Sci U S A 96 [5], Seite 2508-13. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10051673
- 56 Neuroscience, Society for (1999): Policies on the Use of Animals and Humans in Neuroscience Research,
<http://apu.sfn.org/content/Publications/HandbookfortheUseofAnimalsinNeuroscienceResearch/Policy.htm>
- 57 DeOlmos, J. S. und Ingram, W. R. (1971): An improved cupric-silver method for impregnation of axonal and terminal degeneration, Brain Res 33 [2], Seite 523-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4109198
- 58 Carlsen, J. und De Olmos, J. S. (1981): A modified cupric-silver technique for the impregnation of degenerating neurons and their processes, Brain Res 208 [2], Seite 426-31. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6163509
- 59 Alheid, G. F.; Beltramino, C. A.; De Olmos, J. S.; Forbes, M. S.; Swanson, D. J. und Heimer, L. (1998): The neuronal organization of the supracapsular part of the stria terminalis in the rat: the dorsal component of the extended amygdala, Neuroscience 84 [4], Seite 967-96. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9578390
- 60 Ahrens, P.; Schleicher, A.; Zilles, K. und Werner, L. (1990): Image analysis of Nissl-stained neuronal perikarya in the primary visual cortex of the rat: automatic detection and segmentation of neuronal profiles with nuclei and nucleoli, J Microsc 157 (Pt 3), Seite 349-65. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2332885
- 61 Gavrieli, Y.; Sherman, Y. und Ben-Sasson, S. A. (1992): Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation, J Cell Biol 119 [3], Seite 493-501. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1400587
- 62 Cruz-Orive, L. M. und Weibel, E. R. (1990): Recent stereological methods for cell biology: a brief survey, Am J Physiol 258 [4 Pt 1], Seite L148-56. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2185653
- 63 Sherwood, Nancy M. und Timiras, Paola S. (1970): A stereotaxic atlas of the developing rat brain, University of California Press, Berkeley,, ISBN: 520016564.

- 64 Charriaut-Marlangue, C. und Ben-Ari, Y. (1995): A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis, *Neuroreport* 7 [1], Seite 61-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8742417
- 65 Grasl-Kraupp, B.; Ruttkay-Nedecky, B.; Koudelka, H.; Bukowska, K.; Bursch, W. und Schulte-Hermann, R. (1995): In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note, *Hepatology* 21 [5], Seite 1465-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7737654
- 66 Bittigau, P.; Pohl, D.; Siffringer, M.; Shimizu, H.; Ikeda, M.; Ishimaru, M.; Stadthaus, D.; Fuhr, S.; Dikranian, K.; Olney, J. W. und Ikonomidou, C. (1998): Modeling Pediatric Head Trauma: Mechanisms of Degeneration and Potential Strategies for Neuroprotection, *Restor Neurol Neurosci* 13 [1,2], Seite 11-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12671284
- 67 Schäfer, H. (1994): Biomathematik für Mediziner, Skript der Philipps-Universität Marburg, Marburg an der Lahn
- 68 Bittigau, P.; Siffringer, M.; Pohl, D.; Stadthaus, D.; Ishimaru, M.; Shimizu, H.; Ikeda, M.; Lang, D.; Speer, A.; Olney, J. W. und Ikonomidou, C. (1999): Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain, *Ann Neurol* 45 [6], Seite 724-35. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10360764
- 69 Saraste, A. (1999): Morphologic criteria and detection of apoptosis, *Herz* 24 [3], Seite 189-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10412642
- 70 Hwang, J. Y.; Kim, Y. H.; Ahn, Y. H.; Wie, M. B. und Koh, J. Y. (1999): N-Methyl-D-aspartate receptor blockade induces neuronal apoptosis in cortical culture, *Exp Neurol* 159 [1], Seite 124-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10486181
- 71 Ikonomidou, C.; Bosch, F.; Miksa, M.; Bittigau, P.; Vockler, J.; Dikranian, K.; Tenkova, T. I.; Stefovskaja, V.; Turski, L. und Olney, J. W. (1999): Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain, *Science* 283 [5398], Seite 70-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9872743
- 72 Hörster, Friederike (2001): NMDA Rezeptoren und apoptotische Neurodegeneration während der frühen Entwicklung der Ratte, Doctor medicinae, Neuropädiatrie, Charité - Campus Virchow-Klinikum, Berlin.

- 73 Ikonomidou, C.; Bittigau, P.; Ishimaru, M. J.; Wozniak, D. F.; Koch, C.; Genz, K.; Price, M. T.; Stefovská, V.; Horster, F.; Tenkova, T.; Dikranian, K. und Olney, J. W. (2000): Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome, *Science* 287 [5455], Seite 1056-60. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10669420
- 74 Vezzani, A.; Serafini, R.; Stasi, M. A.; Caccia, S.; Conti, I.; Tridico, R. V. und Samanin, R. (1989): Kinetics of MK-801 and its effect on quinolinic acid-induced seizures and neurotoxicity in rats, *J Pharmacol Exp Ther* 249 [1], Seite 278-83. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2540317
- 75 Monyer, H.; Burnashev, N.; Laurie, D. J.; Sakmann, B. und Seeburg, P. H. (1994): Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors, *Neuron* 12 [3], Seite 529-40. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7512349
- 76 Zhong, J.; Carrozza, D. P.; Williams, K.; Pritchett, D. B. und Molinoff, P. B. (1995): Expression of mRNAs encoding subunits of the NMDA receptor in developing rat brain, *J Neurochem* 64 [2], Seite 531-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7830045
- 77 Olney, J. W.; Labruyere, J. und Price, M. T. (1989): Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs, *Science* 244 [4910], Seite 1360-2. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2660263
- 78 Fix, A.S. (1994): Pathomorphological effects of N-methyl-D-aspartate antagonists in the rat posterior cingulate/retrosplenial cerebral cortex, *Drug. Dev. Res.* 24, Seite 147-152.
- 79 Ellison, G. (1994): Competitive and non-competitive NMDA antagonists induce similar limbic degeneration, *Neuroreport* 5 [18], Seite 2688-92. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7696633
- 80 Corso, T. D.; Sesma, M. A.; Tenkova, T. I.; Der, T. C.; Wozniak, D. F.; Farber, N. B. und Olney, J. W. (1997): Multifocal brain damage induced by phencyclidine is augmented by pilocarpine, *Brain Res* 752 [1-2], Seite 1-14. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9106435
- 81 Wozniak, D. F.; Dikranian, K.; Ishimaru, M. J.; Nardi, A.; Corso, T. D.; Tenkova, T.; Olney, J. W. und Fix, A. S. (1998): Disseminated Corticolimbic Neuronal Degeneration Induced in Rat Brain by MK-801: Potential Relevance to Alzheimer's Disease, *Neurobiology of Disease* 5 [5], Seite 305-322. URL:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WNK-45J5CT7-G/2/bc96366a1c1f9c577f82a14db731e3ef>

- 82 Olney, J. W.; Labruyere, J.; Wang, G.; Wozniak, D. F.; Price, M. T. und Sesma, M. A. (1991): NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention, *Science* 254 [5037], Seite 1515-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1835799
- 83 Ishimaru, M.; Fukamauchi, F. und Olney, J. W. (1995): Halothane prevents MK-801 neurotoxicity in the rat cingulate cortex, *Neurosci Lett* 193 [1], Seite 1-4. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7566654
- 84 Jevtovic-Todorovic, V.; Kirby, C. O. und Olney, J. W. (1997): Isoflurane and propofol block neurotoxicity caused by MK-801 in the rat posterior cingulate/retrosplenial cortex, *J Cereb Blood Flow Metab* 17 [2], Seite 168-74. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9040496
- 85 Olney, J. W. und Farber, N. B. (1994): Efficacy of clozapine compared with other antipsychotics in preventing NMDA-antagonist neurotoxicity, *J Clin Psychiatry* 55 Suppl B, Seite 43-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7961572
- 86 Farber, N. B.; Foster, J.; Duhan, N. L. und Olney, J. W. (1995): alpha 2 adrenergic agonists prevent MK-801 neurotoxicity, *Neuropsychopharmacology* 12 [4], Seite 347-9. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7576011
- 87 Farber, N. B.; Hanslick, J.; Kirby, C.; McWilliams, L. und Olney, J. W. (1998): Serotonergic agents that activate 5HT2A receptors prevent NMDA antagonist neurotoxicity, *Neuropsychopharmacology* 18 [1], Seite 57-62. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9408919
- 88 Kim, S. H.; Price, M. T.; Olney, J. W. und Farber, N. B. (1999): Excessive cerebrocortical release of acetylcholine induced by NMDA antagonists is reduced by GABAergic and alpha2-adrenergic agonists, *Mol Psychiatry* 4 [4], Seite 344-52. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10483051
- 89 Hasegawa, M.; Kinoshita, H.; Amano, M.; Hasegawa, T.; Kameyama, T. und Nabeshima, T. (1993): MK-801 increases endogenous acetylcholine release in the rat parietal cortex: a study using brain microdialysis, *Neurosci Lett* 150 [1], Seite 53-6. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8469404
- 90 Farber, N. B.; Wozniak, D. F.; Price, M. T.; Labruyere, J.; Huss, J.; St Peter, H. und Olney, J. W. (1995): Age-specific neurotoxicity in the rat associated with NMDA receptor blockade: potential relevance to schizophrenia?, *Biol Psychiatry* 38 [12], Seite 788-96. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8750036
 - 91 Berridge, M. J.; Bootman, M. D. und Lipp, P. (1998): Calcium--a life and death signal, *Nature* 395 [6703], Seite 645-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9790183
 - 92 McConkey, D. J. und Orrenius, S. (1997): The role of calcium in the regulation of apoptosis, *Biochem Biophys Res Commun* 239 [2], Seite 357-66. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9344835
 - 93 Valjent, E.; Caboche, J. und Vanhoutte, P. (2001): Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase induced gene regulation in brain: a molecular substrate for learning and memory?, *Mol Neurobiol* 23 [2-3], Seite 83-99. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11817219
 - 94 Thiels, E. und Klann, E. (2001): Extracellular signal-regulated kinase, synaptic plasticity, and memory, *Rev Neurosci* 12 [4], Seite 327-45. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11783718
 - 95 Lennmyr, F.; Karlsson, S.; Gerwins, P.; Ata, K. A. und Terent, A. (2002): Activation of mitogen-activated protein kinases in experimental cerebral ischemia, *Acta Neurol Scand* 106 [6], Seite 333-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12460137
 - 96 Curtis, J. und Finkbeiner, S. (1999): Sending signals from the synapse to the nucleus: possible roles for CaMK, Ras/ERK, and SAPK pathways in the regulation of synaptic plasticity and neuronal growth, *J Neurosci Res* 58 [1], Seite 88-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10491574
 - 97 Yano, S.; Tokumitsu, H. und Soderling, T. R. (1998): Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway, *Nature* 396 [6711], Seite 584-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9859994

- 98 Brunet, A.; Datta, S. R. und Greenberg, M. E. (2001): Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway, *Curr Opin Neurobiol* 11 [3], Seite 297-305. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11399427
- 99 Bonni, A.; Brunet, A.; West, A. E.; Datta, S. R.; Takasu, M. A. und Greenberg, M. E. (1999): Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms, *Science* 286 [5443], Seite 1358-62. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10558990
- 100 Cole, A. J.; Saffen, D. W.; Baraban, J. M. und Worley, P. F. (1989): Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation, *Nature* 340 [6233], Seite 474-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2547165
- 101 Wisden, W.; Errington, M. L.; Williams, S.; Dunnett, S. B.; Waters, C.; Hitchcock, D.; Evan, G.; Bliss, T. V. und Hunt, S. P. (1990): Differential expression of immediate early genes in the hippocampus and spinal cord, *Neuron* 4 [4], Seite 603-14. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2108708
- 102 Schulz, S.; Siemer, H.; Krug, M. und Holtt, V. (1999): Direct evidence for biphasic cAMP responsive element-binding protein phosphorylation during long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo, *J Neurosci* 19 [13], Seite 5683-92. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10377374
- 103 Cammarota, M.; Bevilacqua, L. R.; Ardenghi, P.; Paratcha, G.; Levi de Stein, M.; Izquierdo, I. und Medina, J. H. (2000): Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade, *Brain Res Mol Brain Res* 76 [1], Seite 36-46. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10719213
- 104 Hardingham, G. E.; Fukunaga, Y. und Bading, H. (2002): Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways, *Nat Neurosci* 5 [5], Seite 405-14. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11953750
- 105 Silva, A. J.; Kogan, J. H.; Frankland, P. W. und Kida, S. (1998): CREB and memory, *Annu Rev Neurosci* 21, Seite 127-48. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9530494

- 106 Barco, A.; Alarcon, J. M. und Kandel, E. R. (2002): Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture, *Cell* 108 [5], Seite 689-703. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11893339
- 107 Walton, M. R. und Dragunow, I. (2000): Is CREB a key to neuronal survival?, *Trends Neurosci* 23 [2], Seite 48-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10652539
- 108 Mantamadiotis, T.; Lemberger, T.; Bleckmann, S. C.; Kern, H.; Kretz, O.; Martin Villalba, A.; Tronche, F.; Kellendonk, C.; Gau, D.; Kapfhammer, J.; Otto, C.; Schmid, W. und Schutz, G. (2002): Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration, *Nat Genet* 31 [1], Seite 47-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11967539
- 109 Ikonomidou, C. und Turski, L. (2002): Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury?, *Lancet Neurol* 1 [6], Seite 383-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12849400
- 110 Mattson, M. P.; Culmsee, C.; Yu, Z. und Camandola, S. (2000): Roles of nuclear factor kappaB in neuronal survival and plasticity, *J Neurochem* 74 [2], Seite 443-56. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10646495
- 111 Meberg, P. J.; Kinney, W. R.; Valcourt, E. G. und Routtenberg, A. (1996): Gene expression of the transcription factor NF-kappa B in hippocampus: regulation by synaptic activity, *Brain Res Mol Brain Res* 38 [2], Seite 179-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8793106
- 112 Lipsky, R. H.; Xu, K.; Zhu, D.; Kelly, C.; Terhakopian, A.; Novelli, A. und Marini, A. M. (2001): Nuclear factor kappaB is a critical determinant in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuroprotection, *J Neurochem* 78 [2], Seite 254-64. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11461961
- 113 Mattson, M. P. und Camandola, S. (2001): NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders, *J Clin Invest* 107 [3], Seite 247-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11160145
- 114 Yu, Z.; Zhou, D.; Bruce-Keller, A. J.; Kindy, M. S. und Mattson, M. P. (1999): Lack of the p50 subunit of nuclear factor-kappaB increases the vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic injury, *J Neurosci* 19 [20], Seite 8856-65.

URL:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10516305

- 115 Hamburger, V. (1949): Proliferation, differentiation and degeneration of the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions, J. Exp. Zool. 111, Seite 457-502.
- 116 Yuan, J. und Yankner, B. A. (2000): Apoptosis in the nervous system, Nature 407 [6805], Seite 802-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11048732
- 117 Verhage, M.; Maia, A. S.; Plomp, J. J.; Brussaard, A. B.; Heeroma, J. H.; Vermeer, H.; Toonen, R. F.; Hammer, R. E.; van den Berg, T. K.; Missler, M.; Geuze, H. J. und Sudhof, T. C. (2000): Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion, Science 287 [5454], Seite 864-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10657302
- 118 Riccio, A.; Ahn, S.; Davenport, C. M.; Blendy, J. A. und Ginty, D. D. (1999): Mediation by a CREB family transcription factor of NGF-dependent survival of sympathetic neurons, Science 286 [5448], Seite 2358-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10600750
- 119 Tao, X.; Finkbeiner, S.; Arnold, D. B.; Shaywitz, A. J. und Greenberg, M. E. (1998): Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism, Neuron 20 [4], Seite 709-26. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9581763
- 120 Shieh, P. B.; Hu, S. C.; Bobb, K.; Timmusk, T. und Ghosh, A. (1998): Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression, Neuron 20 [4], Seite 727-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9581764
- 121 Lee, H. und Choi, B. H. (1992): Density and distribution of excitatory amino acid receptors in the developing human fetal brain: a quantitative autoradiographic study, Exp Neurol 118 [3], Seite 284-90. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1339116
- 122 Dobbing, J. und Sands, J. (1979): Comparative aspects of the brain growth spurt, Early Hum Dev 3 [1], Seite 79-83. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=118862
- 123 Reich, D. L. und Silvay, G. (1989): Ketamine: an update on the first twenty-five years of clinical experience, Can J Anaesth 36 [2], Seite 186-97. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2650898
- 124 White, P. F.; Way, W. L. und Trevor, A. J. (1982): Ketamine--its pharmacology and therapeutic uses, *Anesthesiology* 56 [2], Seite 119-36. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6892475
 - 125 Jevtovic-Todorovic, V.; Todorovic, S. M.; Mennerick, S.; Powell, S.; Dikranian, K.; Benshoff, N.; Zorumski, C. F. und Olney, J. W. (1998): Nitrous oxide (laughing gas) is an NMDA antagonist, neuroprotectant and neurotoxin, *Nat Med* 4 [4], Seite 460-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9546794
 - 126 Cheung, P. Y.; Peliowski, A. und Robertson, C. M. (1998): The outcome of very low birth weight neonates (≤ 1500 g) rescued by inhaled nitric oxide: neurodevelopment in early childhood, *J Pediatr* 133 [6], Seite 735-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9842035
 - 127 Gressens, P.; Rogido, M.; Paindaveine, B. und Sola, A. (2002): The impact of neonatal intensive care practices on the developing brain, *J Pediatr* 140 [6], Seite 646-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12072865
 - 128 Kinsella, J. P.; Walsh, W. F.; Bose, C. L.; Gerstmann, D. R.; Labella, J. J.; Sardesai, S.; Walsh-Sukys, M. C.; McCaffrey, M. J.; Cornfield, D. N.; Bhutani, V. K.; Cutter, G. R.; Baier, M. und Abman, S. H. (1999): Inhaled nitric oxide in premature neonates with severe hypoxaemic respiratory failure: a randomised controlled trial, *Lancet* 354 [9184], Seite 1061-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10509496
 - 129 Richter, H.J. (1989): *Pharmazeutisch-Medizinisches Lexikon*, VEB-Verlag, Berlin.
 - 130 Lovinger, D. M.; White, G. und Weight, F. F. (1989): Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons, *Science* 243 [4899], Seite 1721-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2467382
 - 131 Hoffman, P. L.; Rabe, C. S.; Moses, F. und Tabakoff, B. (1989): N-methyl-D-aspartate receptors and ethanol: inhibition of calcium flux and cyclic GMP production, *J Neurochem* 52 [6], Seite 1937-40. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2542453
 - 132 Reynolds, J. D. und Brien, J. F. (1995): Ethanol neurobehavioural teratogenesis and the role of L-glutamate in the fetal hippocampus, *Can J Physiol Pharmacol*

- 73 [9], Seite 1209-23. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8748970
- 133 Meyer, L. S.; Kotch, L. E. und Riley, E. P. (1990): Alterations in gait following ethanol exposure during the brain growth spurt in rats, *Alcohol Clin Exp Res* 14 [1], Seite 23-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2178467
- 134 Jones, K. L. und Smith, D. W. (1973): Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy, *Lancet* 2 [7836], Seite 999-1001. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=4127281
- 135 Coles, C. D.; Smith, I. E. und Falek, A. (1987): Prenatal alcohol exposure and infant behavior: immediate effects and implications for later development, *Adv Alcohol Subst Abuse* 6 [4], Seite 87-104. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3425480
- 136 Gilman, S.; Junck, L.; Markel, D. S.; Koeppe, R. A. und Kluin, K. J. (1990): Cerebral glucose hypermetabolism in Friedreich's ataxia detected with positron emission tomography, *Ann Neurol* 28 [6], Seite 750-7. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2285262
- 137 Hatazawa, J.; Brooks, R. A.; Dalakas, M. C.; Mansi, L. und Di Chiro, G. (1988): Cortical motor-sensory hypometabolism in amyotrophic lateral sclerosis: a PET study, *J Comput Assist Tomogr* 12 [4], Seite 630-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3260610
- 138 Dalakas, M. C.; Hatazawa, J.; Brooks, R. A. und Di Chiro, G. (1987): Lowered cerebral glucose utilization in amyotrophic lateral sclerosis, *Ann Neurol* 22 [5], Seite 580-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3501273
- 139 Blass, J. P.; Sheu, R. K. und Cedarbaum, J. M. (1988): Energy metabolism in disorders of the nervous system, *Rev Neurol (Paris)* 144 [10], Seite 543-63. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2973643
- 140 Ford, L. M.; Sanberg, P. R.; Norman, A. B. und Fogelson, M. H. (1989): MK-801 prevents hippocampal neurodegeneration in neonatal hypoxic-ischemic rats, *Arch Neurol* 46 [10], Seite 1090-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2552968

- 141 Hattori, H.; Morin, A. M.; Schwartz, P. H.; Fujikawa, D. G. und Wasterlain, C. G. (1989): Posthypoxic treatment with MK-801 reduces hypoxic-ischemic damage in the neonatal rat, *Neurology* 39 [5], Seite 713-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2651970
- 142 Davis, S. M.; Albers, G. W.; Diener, H. C.; Lees, K. R. und Norris, J. (1997): Termination of Acute Stroke Studies Involving Selfotel Treatment. ASSIST Steering Committed, *Lancet* 349 [9044], Seite 32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8999265
- 143 McBurney, R. N. (1997): Development of the NMDA ion-channel blocker, aptiganel hydrochloride, as a neuroprotective agent for acute CNS injury, *Int Rev Neurobiol* 40, Seite 173-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8989621
- 144 Bittigau, P.; Sifringer, M.; Genz, K.; Reith, E.; Pospischil, D.; Govindarajalu, S.; Dzierko, M.; Pesditschek, S.; Mai, I.; Dikranian, K.; Olney, J. W. und Ikonomidou, C. (2002): Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 [23], Seite 15089-94. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12417760

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologische Gegenüberstellung von Nekrose und Apoptose. Modifiziert nach Blom (7). Adobe Photoshop.	4
Abbildung 2: Schema der apoptotischen Kaskade. Adaptiert nach Toescu [14]. Adobe Illustrator.....	6
Abbildung 3: Zwei Modellvorstellungen zur Transmembrantopologie der NMDA- Rezeptoruntereinheit [23]. Microsoft Word.	9
Abbildung 4 a und b: Schwarz-Weiß-Aufnahme koronarer Hemisphärenpräparate von acht Tage alten Ratten (Übersicht). Photo, Kupfer-Silberfärbung.	26
Abbildung 5 a und b: Farbaufnahme koronarer Hirnschnittpräparate acht Tage alter Ratten (Detail). Photo, Kupfer-Silberfärbung.	27
Abbildung 6: Säulendiagramm: Nervenzelluntergang in verschiedenen Hirnarealen nach Behandlung mit (+)MK801 oder NaCl. Excel.	29
Abbildung 7 a-b: Hirnschnittpräparate mit Detailansicht der Lamina II des Cortex parietalis acht Tage alter Ratten. Photo, TUNEL-Färbung.	30
Abbildung 8 a-d: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einzelner degenerierter Neuronen acht Tage alter Ratten. Photos wurden im Labor von John Olney, Washington University School of Medicine, 4940 Children's Place, St. Louis, MO 63110, USA, hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt, Adobe Photoshop.	31
Abbildung 9: Diagramm der Entwicklungsstudie: Apoptose-Score des gesamten Gehirns verschiedener Altersgruppen. SigmaPlot.	32
Abbildung 10: Schemata von Hemisphärenquerschnitten 1 bis 22 Tage alter Ratten mit graphischer Darstellung apoptotischer Zelluntergänge in verschiedenen Hirnarealen. Picture It.....	34

Abbildung 11: Schema mit Bezeichnung der untersuchten Hirnregionen. Microsoft Word.....	34
Abbildung 12: Signaltransduktion nach NMDA-Rezeptorstimulation. Modellvorstellung zur antiapoptotischen Wirkung. Modifiziert nach Ikonomidou (109). Adobe Photoshop.	42
Tabelle 1: Glutamaterezeptorsubtypen NMDA-, AMPA-, Kainat- und metabotrope Rezeptoren mit ihren Untereinheiten. Adaptiert nach Dingledine (21), Adobe Illustrator.....	8
Strukturformeln: Spezifische Liganden von Glutamaterezeptoren. ChemFinder und ChemDraw.	8 & 48

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Hrissanthi Ikonomidou für die hervorragende und geduldige Betreuung und Unterstützung bei dieser Arbeit bedanken. Für die freundliche Hilfestellung bei der experimentellen Arbeit danke ich insbesondere Dr. Daniela Pohl, Jessica Faßbender (ehem. Vöckler) und Dr. Petra Bittigau.

Besonderem Dank verpflichtet bin ich auch Christine Illy für die technische Beratung bei den Grafiken und für das Korrekturlesen. Meiner Familie danke ich für die finanzielle und moralische Unterstützung während meiner Studienzeit.

Allen Freunden und Kollegen danke ich für anregende Diskussionen.

Michael Miksa
North Shore University Hospital Manhasset
350 Community Dr., Room 201
Manhasset, New York 11030

New York, den 19. September 2003

Eidesstattliche Erklärung

hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Michael Miksa